

Université de Montréal

**Identification et caractérisation des protéines
responsables de l'entrée en phase M chez *Lingulodinium*
*polyedrum***

par

Philippe Daoust

Département de Sciences Biologiques

Faculté des Arts et Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M. Sc.)

en Sciences Biologiques

Mars 2012

© Philippe Daoust, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Identification et caractérisation des protéines responsables de l'entrée en phase M chez
Lingulodinium polyedrum

présenté par :
Philippe Daoust

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Mario Cappadocia, président-rapporteur

David Morse, directeur de recherche

Annie Angers, membre du jury

Résumé

Les dinoflagellés sont des eucaryotes unicellulaires qui composent une grande partie du phytoplancton et qui jouent un rôle important au niveau de la photosynthèse, de la production primaire et de la conservation des écosystèmes marins. Les dinoflagellés se distinguent des autres eucaryotes par leur biologie et leur organisation nucléaire unique. Lors de la mitose, leur membrane nucléaire demeure intacte et la ségrégation des chromosomes se fait à partir de fuseaux mitotiques formés dans le cytoplasme et qui traversent le noyau au travers de canaux spécialisés. Aussi, leurs chromosomes sont condensés en permanence et le processus utilisé pour y arriver est encore très mal compris puisque les dinoflagellés ne possèdent aucunes histones détectables.

Lingulodinium polyedrum est un dinoflagellé photosynthétique marin utilisé comme organisme modèle en ce qui concerne l'étude des rythmes circadiens (bioluminescence, migration verticale, mitose et photosynthèse). La découverte et l'étude des éléments régulateurs du cycle cellulaire peuvent nous amener à comprendre le mécanisme, l'influence et la portée du contrôle circadien sur le cycle cellulaire. De plus, l'étude du cycle cellulaire pourrait permettre de révéler des indices quant aux caractéristiques singulières des dinoflagellés qui sont pour le moment énigmatiques.

Par le passé, une étude chez *Lingulodinium polyedrum* a permis d'identifier la cycline impliquée dans la mitose, LpCyc1, le premier régulateur du cycle cellulaire à être découvert chez les dinoflagellés. La présente étude s'attarde sur la caractérisation de la LpCyc1, soit son expression, sa localisation, sa phosphorylation. Ces trois éléments concordent de façon à synchroniser l'activité de la LpCyc1 (et ainsi la mitose) de façon circadienne.

Cette étude présente aussi la création et le développement d'un outil majeur pour l'étude future de *Lingulodinium polyedrum*, le transcriptome des ARNm à partir d'un

séquençage Illumina. C'est d'ailleurs avec cet outil que nous avons découvert la CDK responsable du contrôle de la phase M, LpCdk1. Cette CDK possède tous les domaines d'une CDK classique, un site de liaison des substrats, un site de liaison à l'ATP, une boucle activatrice, et une interface de liaison avec la cycline.

Le transcriptome de *Lingulodinium polyedrum* a aussi permis de recenser toutes les protéines conservées normalement retrouvées dans le contrôle du cycle cellulaire, qui nous a permis de faire une ébauche préliminaire du cycle cellulaire de *L. polyedrum*. Cette analyse est une première chez *Lingulodinium polyedrum* et peut s'étendre pour l'étude d'une multitude d'autres processus métaboliques.

Mots-clés : *Lingulodinium polyedrum*, dinoflagellé, cycle cellulaire, rythme circadien, mitose, CDK, LpCyc1, Illumina, transcriptome

Abstract

Dinoflagellates are unicellular eukaryotes that constitute a large part of the phytoplankton. They are major contributors to the global photosynthesis and primary production and they possess an important role in conservation of marine ecosystems. Dinoflagellates are distinguished from other eukaryotes by their unique biology and nuclear organization. During mitosis, their nuclear envelope stays intact and chromosome segregation is done by a mitotic spindle that passed through the nucleus inside several specialized cytoplasmic channels. In addition, the chromosomes are permanently condensed and are not thought to have histones.

Lingulodinium polyedrum is a marine photosynthetic dinoflagellate widely used to study the control mechanisms of circadian rhythms, because many aspects of its physiology (bioluminescence, mitosis, photosynthesis and vertical migration) are circadian. The discovery of cell cycle regulators is essential for understanding the mechanism and the circadian control over the cell cycle.

A previously study identified the M-phase cyclin, LpCyc1, the first dinoflagellate cell cycle regulator to be discovered. The present study presents the characterization of the LpCyc1, with respect to expression levels and phosphorylation patterns. These elements act together to ensure the synchronization of the LpCyc1 activity (and the mitosis) within the day.

This study also presents the creation and the development of the transcriptome, a major tool for the upcoming studies of *Lingulodinium polyedrum*. With this tool, we identified the *Lingulodinium polyedrum* M-CDK, LpCdk1. The LpCdk1 has all the domains of a classic M-CDK, a substrate binding site, an ATP binding site, an activation loop and a cyclin binding interface.

With the *Lingulodinium polyedrum* transcriptome, we also made a census of all the conserved proteins normally found in the cell cycle control of yeast. The identification of these proteins had provided a rough shape of *L. polyedrum* cell cycle. This kind of analysis is the first to be made with *Lingulodinium polyedrum* and could be expanded to other metabolic processes.

Keywords : *Lingulodinium polyedrum*, dinoflagellates, cell cycle, circadian rythm, mitosis, CDK, LpCyc1, Illumina, transcriptome

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xii
Liste des abréviations	xii
Dédicace	xiv
Remerciements	xv
1. Introduction	1
1.1. Dinoflagellés	1
1.1.1. Biologie générale	1
1.1.2. Matériel génétique	3
1.1.3. Rythmes biologiques	8
1.2. Cycle cellulaire	10
1.2.1. Éléments de base du cycle	10
1.2.2. Composants importants de la régulation du cycle cellulaire	20
1.2.3. Processus importants dans la régulation du cycle	27
1.2.4. Interactions avec l'horloge circadienne	35
1.3. Étude du cycle cellulaire chez les dinoflagellés	39
1.4. Approches et objectifs	41
2. Matériel et méthodes	43
2.1. Entretien des cultures	43
2.2. Synthèse de l'anticorps	43
2.3. Spécificité de l'anticorps	44
2.4. Patron de phosphorylation	44
2.5. Microscopie électronique à transmission	46

2.6. Cytométrie en Flux.....	46
2.7. Séquençage.....	47
3. Résultats	49
3.1. LpCyc1	49
3.1.1. Spécificité de l'anticorps.....	49
3.1.2. Patron d'expression protéique.....	49
3.1.3. Phosphorylation	50
3.2. Séquençage du transcriptome.....	52
3.2.1. Séquençage 454.....	52
3.2.2. Séquençage Illumina	53
3.2.3. M-CDK	54
3.2.4. Protéines régulatrices du cycle cellulaire.....	55
4. Discussion	60
4.1. Time-Course de la LpCyc1	60
4.2. Phosphorylation	60
4.3. Localisation	61
4.4. Transcriptome 454	62
4.5. Transcriptome Illumina.....	64
4.6. CDK	65
4.7. Protéines régulatrices du cycle cellulaire	67
4.7.1. Transition G1/S	68
4.7.2. Transition G2/M.....	71
5. Conclusion	75
6. Bibliographie.....	76
7. Annexe	I
7.1. Annexe 1. Alignement du contig 3321 et de la Cdc28	I

7.2. Annexe 2. Tableau des principales protéines du cycle cellulaire retrouvées dans le transcriptome de <i>Lingulodinium polyedrum</i> associées à des séquences connues pas tBLASTn.....	II
7.3. Annexe 3. Spécificité de l'anticorps anti-LpCyc1 observée au MET.....	III

Liste des tableaux

Tableau I. Principales CDK et Cyclines retrouvées chez les vertébrés, <i>S. cerevisiae</i> et <i>S. pombe</i>	14
Tableau II. Statistiques du pyroséquençage 454 et du séquençage Illumina	53

Liste des figures

Figure 1. Oscillation des cyclines dans le contrôle du cycle cellulaire.	12
Figure 2. Contrôle de l'initialisation de la réplication de l'ADN.	17
Figure 3. L'initiation de la duplication du génome régulée par les cyclines chez <i>S. cerevisiae</i>	18
Figure 4. La régulation du complexe Cdk1/CyclineB par Cdc25 et WEE1 chez <i>S. pombe</i>	25
Figure 5. Structure des complexes de dégradation SCF et APC/C.	33
Figure 6. Régulation de WEE1 par l'horloge.	37
Figure 7. Caractérisation de LpCyc1 par transfert Western.	51
Figure 8. Couverture des EST de <i>Lingulodinium polyedrum</i> par les séquençages Illumina et 454.	54
Figure 9. Séquences de la LpCdk1.	57
Figure 10. Couverture des protéines régulatrices du cycle cellulaire de <i>S. cerevisiae</i> par le transcriptome de <i>Lingulodinium polyedrum</i>	59

Liste des abréviations

2D	bidimensionnel
AAA	ATPases associées à différentes activités cellulaires
ADN	acide désoxyribonucléique
APC	complexe favorisant l'anaphase
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine tri-phosphatée
BLAST	outil de recherche d'alignement local de base
BSA	albumine sérique de boeuf
CAK	kinase activatrice de CDK
CCMP	collection nationale de culture de phytoplankton marin
CDC	cycle de division cellulaire
CDK	kinase cycline-dépendante
ADNc	ADN complémetaire
CKI	inhibiteur de CDK
CO₂	dioxyde de carbone
Cyc	cycline
DEPC	diéthylène pyrocarbonate
DTT	dithiothréitol
EDTA	acide éthylènediamine tétraacétique
EST	marqueur de sequence exprimée
E Value	valeur attendue
g	gravité
G1	(anglais : gap 1)
G2	(anglais : gap 2)
h	heure
HABs	population explosive d'algues nocives
HCl	chlorure d'hydrogène
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
IEF	focalisation isoélectrique
IPG	gradient de pH immobilisé
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
L	litre
LBP	protéine liant la luciférine
LD	jour/nuit
Lp	<i>Lingulodinium polyedrum</i>
m	mètre
M	molaire
MBF	facteur de liaison de Mlu1

g	microgramme
mg	milligramme
mL	millilitre
m	micromètre
mM	millimolaire
mol	micromolaire
MPF	facteur initiant l'entrée en mitose / la maturation
ORC	complexe de l'origine de réplication
ORF	cadre de lecture ouvert
PCP	protéine-a périodine-chlorophylle
PCR	réaction en chaîne de la polymérase
phase M	phase mitotique
phase S	phase de synthèse d'ADN
Poly(A)	polyadénylé
SBF	facteur de liaison de Swi4/6
SCF	protéine Skp1/Cullin/F-box
SDS	sulfate dodécyle de sodium
SDS-PAGE	électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium
SL	(anglais : spliced leader)
UTR	région non-traduite

À Normski et la fouine

Remerciements

Merci tout d'abord à Bacco, je crois que je n'aurais pas pu finir sans toi. Avec mon laxisme et ma procrastination digne de Piled Higher & Deeper, je n'aurais pu y arriver sans ton pushing et tes coups de pied dans le derrière à répétition.

Merci aussi à ma famille (Normand, Lyne, M-C 4 poches, Vivi, Fred, Jo, Thierry, Anabelle, Papi Jean-Guy, Mami Michou, Johanne, Pierrot, Chantale, Pierre, Audrey, Patrick ainsi que les Tremblay et les Pilon) pour leur support tout au long de mes études. J'ai quêté de l'argent, des lifts, des voitures, de l'hébergement et j'en passe. Pendant tout ce temps, vous m'avez octroyé un appui indéfectibles et des encouragements sans bornes sans lesquels je n'aurais pas réussi.

Merci également à mes amis, Steve, Marc, Hugo, Bruno, Didz, Kev, M-Crisse et Dave qui m'ont permis de décrocher quand ce n'était plus le temps de travailler. Merci aussi au staff de la salle d'embauche qui faisait en sorte qu'on ne se sentait pas vraiment au travail même si je l'étais en fait. Un autre merci à tout le personnel de l'IRBV, professeurs, chercheurs et étudiants qui font de cet institut un milieu de recherche convivial.

Je remercie aussi tous les membres du laboratoire Morse. Thierry qui a été un mentor formidable, Steve pour sa joie de vivre, Jo le geek de service, Mathieu l'anti-américain linuxien et Sougata qui a fait en sorte que je n'étais plus seul. Merci aussi à Mario pour ses recettes, sa cuisine et ses connaissances historiques et culturelles sans limites, tout comme son amour pour Dieu et l'Église. Un merci spécial à David qui a été un directeur incroyable. Sa méthode d'enseignement m'a permis de devenir efficace, curieux, débrouillard et indépendant, des qualités essentielles à tout bon scientifique.

À vous tous, veuillez agréer mes sentiments les plus distingués, soyez assurer de mon amour inconditionnel et soyez assurer de mon entière dévotion beau temps mauvais temps, que le bonheur submerge votre demeure jusqu'à ce que les plafonniers fleurissent avec des ballon, des confettis, des serpentins et des petites filles en robe rose avec un sucette.

1. Introduction

1.1. Dinoflagellés

1.1.1. Biologie générale

Les dinoflagellés sont des eucaryotes faisant anciennement partie du règne des protistes, qui rassemblait environ 4000 espèces hétérogènes. Les dinoflagellés sont retrouvés dans les eaux douces tout comme dans les océans où ils représentent, avec les diatomées, les deux plus grands groupes de phytoplancton. À l'échelle planétaire, le phytoplancton est responsable de la moitié de la photosynthèse et de la production primaire ¹. Environ 50% des espèces de dinoflagellés sont phototrophes. La majorité des autres espèces sont hétérotrophes et il existe quelques espèces mixotrophes (phototrophe et hétérotrophe). La plupart des dinoflagellés nagent librement, mais certains vivent en tant que parasite ou encore en symbiose. Par exemples, des algues unicellulaires photosynthétiques (zooxanthelles) s'associent avec les coraux, leur fournissant ainsi jusqu'à 50% de leur apport en carbone ². Avec le réchauffement climatique, on assiste de plus en plus au blanchiment de coraux, car plusieurs dinoflagellés sont très sensibles aux changements de température et les coraux perdent leur symbionte s'il fait trop chaud ³. Dans le cadre des études sur le réchauffement global de la planète, les dinoflagellés sont mis en avant-plan, car une grande quantité du CO₂ fixé dépend d'eux.

Les dinoflagellés sont aussi responsables d'un phénomène communément appelé la marée rouge. Cette marée rouge est causée par une augmentation exponentielle des populations de dinoflagellés, ce qui monopolise les ressources du milieu. Ces marées rouges sont aussi dangereuses, car certains dinoflagellés sécrètent des toxines qui se retrouvent en grande concentration lors de ce phénomène. Comme ce ne sont pas tous les dinoflagellés qui produisent ces toxines et que d'autres ne sont pas pigmentés, il est plus exact de se référer à ce phénomène de surpopulation explosive d'algues nocives pour l'humain en tant que HABs (population explosive d'algues nocives). La plupart des

intoxications humains se font indirectement par l'entremise de mollusques bivalves qui, en filtrant l'eau de mer pour se nourrir, accumulent ces toxines. Lorsque ces derniers sont ingérés par l'homme, les effets de l'intoxication peuvent aller jusqu'à la mort. Par contre, ces toxines peuvent aussi être utiles, car elles sont utilisées en pharmacutique afin de créer de nouvelles molécules qui, entre autre, servent à contrôler certaines formes de cancer ⁴.

Comme leur nom l'indique, les dinoflagellés possèdent des flagelles. Ces deux flagelles, l'un transversal et l'autre longitudinal, sont présents à un stade ou à un autre de leur cycle de vie. La position de ces flagelles leur procure un mouvement de nage en spirale caractéristique à l'origine de leur appellation « dinoflagellés » (grec : « dinos » = tourbillon). Ce mouvement permet aux dinoflagellés d'atteindre une vitesse de pointe pouvant aller jusqu'à 370 $\mu\text{m/s}$. La plupart sont aussi recouverts d'une thèque de cellulose de forme variée ayant permis leur classification. D'ailleurs, la classification des dinoflagellés est un sujet chaud au sein de plusieurs groupes de chercheurs. Les zoologistes les considèrent comme des protozoaires et les botanistes comme des algues. Les dinoflagellés étaient anciennement classés sous le 4^e règne des eucaryotes, soit les protistes, qui rassemblaient tous les eucaryotes autres que les animaux (Métazoaires), les plantes (des Embryophytes aux Archaeplastida) et les champignons (Eumycètes). Ce groupe comportait des organismes à organisation cellulaire dite « simple », soit unicellulaire ou encore multicellulaire sans tissus spécialisés. Ce n'est que récemment qu'une révision complète des protistes a été publiée en se basant sur des études de phylogénie moléculaire et des observations ultrastructurales ⁵. Dans la classification phylogénétique moderne, comme le caractère polyphylétique des protistes a été démontré, ce règne a disparu et ses espèces dispersées dans le domaine des eucaryotes sous une soixantaine de lignées. Les dinoflagellés sont retrouvés dans le supergroupe des *Chromalveolata*, qui est un regroupement des organismes dont le plastide provient d'une endosymbiose secondaire d'un *Archaeplastide* ancestral provenant d'une algue rouge, qui peut avoir été par la suite réduit, perdu et parfois réacquis par une endosymbiose tertiaire. L'acquisition du chloroplaste est encore sujette à débat, car certaines hypothèses impliquent une

endosymbiose quaternaire ⁶. Le groupe des *Alveolata* est composé des *Apicomplexa*, des *Ciliés* et des *Dinoflagellata*, et est caractérisé par les alvéoles corticales, pouvant contenir ou non du matériel granulaire. Les *Dinoflagellata* diffèrent des deux autres embranchements par la présence de fuseaux mitotiques extranucléaires et la présence de deux flagelles. Les *Dinophyceae* (dinoflagellés) se distinguent dans les *Dinoflagellata* par leur structure chromosomique sans histones. Les différentes espèces des *Dinophyceae* sont ensuite classées conformément à la structure de leur thèque. *Lingulodinium polyedrum*, dont la thèque est composée de série de 5 ou 6 plaques latitudinales, est classé parmi les *Peridiniphyceidae*, qui possèdent spécifiquement la péricidine, un caroténoïde qui s'associe avec la chlorophylle.

1.1.2. Matériel génétique

1.1.2.1. Organisation du noyau

L'ADN des dinoflagellés est différente des autres eucaryotes, tant au niveau de l'organisation de son chromosome qu'à la composition de ses bases. Ces différences sont si flagrantes qu'autrefois les dinoflagellés étaient classés dans un règne intermédiaire entre les procaryotes et les eucaryotes : les mesocaryotes ⁷. Ce sont des organismes haploïdes possédant une grande concentration en ADN variant de 6 pg jusqu'à 400 pg par noyau, tandis que celle des eucaryotes varie généralement de 0,04 à 3 pg et va jusqu'à 40 pg chez quelques plantes^{8, 9}. Une reconstruction d'image prise avec un MET (microscope électronique à transmission) a permis d'observer que le chromosome ressemble à des planches de contreplaqué et correspondent à une forme cholestérique de la matière formée de cristaux liquides d'ADN ¹⁰. Le rôle de cet agencement serait de minimiser l'enchevêtrement des chromosomes après la réplication, ce qui faciliterait par la suite la ségrégation ¹¹.

L'organisation de ce génome est aussi très particulière, les chromosomes sont condensés tout au long du cycle cellulaire, à l'encontre des autres eucaryotes chez qui les

chromosomes se condensent seulement lors de la mitose. Bien que le chromosome soit condensé à la mitose, il existe plusieurs états de condensation qui varient légèrement pendant l'interphase. En phase G1, les chromosomes sont desserrés avec plusieurs protubérances cytoplasmiques et dans la phase S on observe le taux le plus élevé de déroulement du chromosome, ce qui pourrait faciliter la réplication de l'ADN ^{12, 13}. Les chromosomes sont attachés à la membrane nucléaire et possèdent une organisation unique ^{7, 14, 15}. Les dinochromosomes présentent des bandes et une organisation en forme de « C » lorsqu'observés au microscope électronique à transmission (MET). La cryofracture permet d'observer une organisation cholestérique (cristaux liquides superposés organisés en hélice) de leur ADN avec un enroulement vers la gauche ^{10, 13, 16}. Puis c'est en G2 que les chromosomes redeviennent étroitement condensés.

Des analyses biochimiques et ultrastructurelles confirment que les dinoflagellés ne possèdent ni histones, ni nucléosomes ^{8, 17}. Comme le chromosome est condensé tout au cours du cycle cellulaire, un mécanisme est requis pour déroulé des régions précises à des fins de transcription. Sans histones et avec un ratio protéines/ADN de 1 :10 au lieu de 1 :1 comme chez les autres eucaryotes ^{14, 18}, le mécanisme de condensation de leur ADN en chromatine fonctionnelle reste une énigme. Des études d'immunofluorescence au microscope électronique démontrent que des protéines similaires aux histones (HLP) sont localisées sur la chromatine active à la périphérie du chromosome en G1, puis sont dispersées à travers tout le chromosome pendant la mitose, ce qui suggère qu'ils ne jouent pas un rôle au niveau de l'organisation structurel de l'ADN, mais bien qu'ils seraient plutôt impliquées dans la régulation et l'expression des gènes. ¹⁸.

La composition du génome est aussi atypique que son organisation. Leur ADN est riche en G-C ¹⁹ et contient des bases rares modifiées (allant jusqu'à 70% des bases) distribuées de façon non-aléatoire dans le génome. Ces modifications, spécifiques au phylum, s'appliquent à la thymine qui est substituée par le 5-hydroxyméthyluracil (HOMeU), l'adénine qui est substituée par le N6-méthyladénine et la cytosine qui est

substituée par le 5-méthyl-cytosine (5-MeC). L'HOMeU pourrait conférer à l'ADN des propriétés de liaisons qui pourraient expliquer la condensation de son génome ^{20, 21}. L'ADN génomique des dinoflagellés contient jusqu'à 60% de séquences répétitives. L'arrangement de ces séquences répétées ressemble partiellement à celui des autres eucaryotes, mais une fraction présente une distribution atypique qui pourrait être corrélée à une organisation de l'ADN qui reste pour l'instant inconnue ^{22, 23}.

La mitose des dinoflagellés est si inhabituelle par rapport aux autres eucaryotes qu'elle porte son propre nom, soit la dinomitose. À l'instar des autres eucaryotes, la membrane nucléaire ne se dissout pas lors de la mitose. Ce maintien de l'enveloppe nucléaire est aussi observé chez d'autres organismes (diatomées, euglènes et levures) chez qui la ségrégation des chromosomes se fait avec l'aide de fuseaux mitotiques intracellulaires, alors que chez les dinoflagellés, elle se fait avec des fuseaux mitotiques extranucléaires qui n'entrent jamais en contact direct avec le chromosome ^{24, 25}. Ces fuseaux mitotiques sont formés dans le cytoplasme et traversent le noyau à l'intérieur de canaux ²⁶. Les études de structures proposent que le contact entre le kinétochore et le fuseau mitotique se fasse à travers la membrane nucléaire ²⁷. Il se pourrait qu'il y ait un autre processus, en plus des microtubules, impliqué dans la ségrégation des chromosomes chez les dinoflagellés. Un composé chimique anti-microtubule, la nocadazole, n'arrive qu'à ralentir brièvement le cycle cellulaire chez les dinoflagellés (2 à 4 heures, soit 30-50% du cycle), tandis qu'il inhibe le cycle cellulaire beaucoup plus longtemps (2 à 3 fois cycles complets) chez les autres organismes ²⁸. Une découverte récente démontre que la ségrégation des chromosomes chez la bactérie se fait avec des brins d'actine ²⁹. Cette approche reste à vérifier chez les dinoflagellés.

1.1.2.2. Caractéristiques particulières

À l'exception des gènes de rRNA, seulement quelques gènes cibles ont été clonés et caractérisés. Jusqu'à maintenant, tous les gènes de dinoflagellés étudiés sont retrouvés en multiples copies répétées organisées en tandem au niveau génomique et sont donc

hautement exprimés. Ils font parti de familles complexes comme la luciférase (LBF), la luciférine-binding protein (LBP)³⁰⁻³², la peridinin chlorophyll protein (PCPs) et les light-harvesting complex (LHCs)^{33,34}.

Parmi les caractéristiques remarquables des gènes de dinoflagellés analysés jusqu'à maintenant, figurent l'absence d'une boîte TATA ou d'une séquence consensus dans leurs promoteurs. Plusieurs de ces gènes n'ont pas d'introns et produisent des ARNm silencieux ou polycistroniques³⁵. Toutes ces caractéristiques prises en compte indiquent que l'organisation des gènes, leur régulation et leur expression diffèrent chez les dinoflagellés par rapport aux autres eucaryotes.

Même si des analyses confirment la prévalence d'un système de contrôle transcriptionnel chez les dinoflagellés³⁶, la plupart des gènes semblent être transcrits constitutivement et sont donc régulés de façon post-transcriptionnelle^{37,38}.

1.1.2.3. Trans-Spliced-Leader des dinoflagellés

Le trans-splicing du spliced-leader (SL) est un mécanisme dans lequel une séquence de 15 à 50 nucléotides (SL) est transférée de l'extrémité 5' d'un ARN non-codant (ARN-SL) à l'extrémité 5' d'un ARNm. L'ARN-SL non codant possède normalement deux domaines fonctionnels : un exon (SL), qui est transféré sur un ARNm codant, et un intron, qui contient un site de liaison pour une ribonucléoprotéine (Sm) qui facilite l'épissage. Le trans-splicing de SL a été bien étudié chez les euglènes, nématodes, cnidaires, rotifères, Platyhelminthes, ascidians et appendicularia³⁹⁻⁴¹. L'ARN SL conserve toujours ses deux sous-unités à travers les différents phylums, bien qu'il ne présente qu'une faible similarité au niveau de sa séquence⁴⁰. Le trans-splicing peut posséder une variété de fonctions comme générer des ARNm monocistroniques à partir de transcrits précurseurs polycistroniques, assainir l'extrémité 5' des ARNm, stabiliser les ARNm ou encore réguler la traduction des gènes³⁹⁻⁴¹. Chez les dinoflagellés, la fonction exacte est pour l'instant

inconnue. Avec les études actuelles, une seule de ces fonctions a été écartée, soit l'assainissement de l'extrémité 5' des ARNm, toutes les autres demeurent probables ⁴².

Bien que la séquence SL (DinoSL) DCCGUAGCCAUUUUGGCUCAAG (D =U, A, or G) soit conservée à l'intérieur de toutes les espèces de dinoflagellés étudiées jusqu'à présent, SL ne présente aucune similarité avec les autres organismes. De plus, comme mentionné plus haut, le domaine Sm est normalement situé dans l'intron de la séquence, alors qu'il est situé dans l'exon chez les dinoflagellés. Ces observations suggèrent que les dinoflagellés ont soit adopté un site de liaison Sm ne respectant aucune caractéristique des autres sites de liaison Sm connus, ou encore que le site de liaison Sm situé dans l'exon possède une fonction dans l'épissage de la séquence SL ⁴². De plus, l'extrémité 5' est généralement un U ou un A, une caractéristique qui pourrait affecter la coiffe, et ainsi la traduction et la stabilité de l'ARN auquel SL s'associe. Chez les vertébrés, le complexe SM s'associe avec de petits ARN (snRNA) pour le signal d'import nucléaire. La présence du motif SM-binding dans la séquence SL est un paradoxe dans le sens que SL reste sur les ARNm matures et n'affecte pas la localisation ou la traduction de ces ARNm ⁴³.

Dans plusieurs espèces de dinoflagellés, la séquence SL est trouvée (partielle ou complète) à l'extrémité 5' de gènes codant pour des protéines ^{44, 45}, ce qui a mené à l'idée que le génome nucléaire puisse recycler les ARNm épissés en ADN génomique ⁴⁴. Par contre, on ne peut pas écarter l'idée que le gène SL s'est propagé dans le génome par recombinaison, ou encore l'ARN SL a pu s'insérer lui-même dans plusieurs endroits du génome, en faisant office de transposons. Quoiqu'il en soit, le mécanisme par lequel la séquence SL est apparue dans le génome des dinoflagellés est toujours incertain et au fur et à mesure qu'il est étudié, il apparaît de plus en plus complexe ^{45, 46}.

Curieusement, un problème majeur avec l'étude de SL est qu'il est difficile pour l'instant de prouver s'il est présent sur tous les transcrits, ou encore s'il est présent seulement sur certains transcrits des dinoflagellés. Une des études portant sur le sujet suggère que SL se retrouve seulement sur les transcrits hautement exprimés organisés en

tandem, tandis que les gènes faiblement exprimés (encore non caractérisés) en sont exempts⁴⁷, alors que d'autres affirment que SL se retrouvent sur tous les ARNm.

Jusqu'à ce qu'un transcriptome complet d'un dinoflagellé soit séquencé, il est difficile de supporter une hypothèse ou l'autre. L'étude de séquences d'ADNc sélectionnées au hasard peut facilement être biaisée. De plus, comme la séquence SL se retrouve à l'extrémité 5' des ARNm, il faut posséder des ADNc intacts pour l'étude de SL. Plusieurs dinoflagellés possèdent de forts inhibiteurs empêchant soit la reverse transcriptase ou encore la polymérase d'ADN Taq. Ces facteurs peuvent expliquer l'absence de la séquence SL sur certains ARNm⁴⁵. Le transcriptome du dinoflagellé *Lingulodinium polyedrum* apporte de nouvelles informations quant à la présence de SL sur les ARNm des dinoflagellés.

1.1.3. Rythmes biologiques

Les rythmes biologiques contrôlent une panoplie de comportements saisonniers tels que la migration et l'hibernation chez les eucaryotes supérieurs. À plus court terme, ils permettent aussi de réguler la faim et le sommeil. Les rythmes biologiques qui ont une période d'environ 24 heures sont appelés les rythmes circadiens.

Afin qu'un comportement physiologique soit considéré comme un rythme circadien, il doit répondre à plusieurs critères. Premièrement, comme mentionné auparavant, le caractère ciblé doit se répéter quotidiennement selon une périodicité s'approchant de 24 heures. Deuxièmement, le rythme circadien doit être endogène à l'organisme, l'organe ou encore la cellule. Pour être certain que le rythme n'est pas induit par des facteurs extérieurs comme la lumière et/ou la température, le comportement doit perdurer dans un environnement constant (température et/ou lumière). Finalement, le rythme circadien doit être capable de se synchroniser avec les signaux de son environnement. Comme expliqué ci-dessus, la périodicité d'un rythme circadien doit s'approcher de 24h. Ces sont les signaux extérieurs qui vont permettre de synchroniser le comportement avec les besoins

relatifs au milieu. Les rythmes circadiens découlent d'une régulation à partir d'horloges moléculaires, mais qui ne sont pas elles-mêmes considérés comme des horloges.

Lingulodinium polyedrum est un dinoflagellé unicellulaire phototrophe mesurant 40 µm qui nage librement dans l'eau salée. Il possède plusieurs rythmes circadiens bien étudiés : la migration verticale, la photosynthèse, la bioluminescence et le cycle cellulaire. La migration verticale est en phase avec la photosynthèse, puisque pendant la journée *Lingulodinium polyedrum* se tient près de la surface de l'eau afin d'absorber un maximum de lumière pour effectuer efficacement la photosynthèse. Lorsque la nuit vient, les cellules migrent jusqu'à environ 10 m sous la surface de l'eau. Pendant la nuit, même si la cellule est exposée à une source lumineuse, il n'y aura pas de photosynthèse à cause de contrôle circadien des organelles de la cellule. La bioluminescence a une phase inverse à la photosynthèse. Lorsque les cellules sont soumises à un mouvement brusque, elles vont émettre une lumière bleutée, mais seulement pendant la nuit. Le dernier rythme circadien bien connu de *Lingulodinium polyedrum* est le cycle cellulaire. Une heure après le lever du soleil, selon un intervalle qui varie de 3 à 5 jours, les cellules se divisent⁴⁸.

Les recherches présentées dans ce mémoire tentent d'apporter une lumière sur le fonctionnement et la régulation du cycle cellulaire chez le dinoflagellé *Lingulodinium polyedrum*. Malheureusement, peu de composantes du cycle cellulaire chez les dinoflagellés sont connues. L'étude du cycle cellulaire repose essentiellement sur la compréhension de ce dernier chez d'autres organismes mieux connus, car il a déjà été démontré que les dinoflagellés possèdent plusieurs éléments classiques du cycle cellulaire

1.2. Cycle cellulaire

1.2.1. Éléments de base du cycle

L'aboutissement de la division cellulaire est de former deux cellules filles identiques à la cellule mère. Afin que cette division ait lieu correctement, la cellule doit passer au travers d'une série ordonnée d'événements complexes, appelés le cycle cellulaire. Plusieurs étapes de ce cycle cellulaire sont universelles, comme par exemple, la duplication du matériel génétique et la ségrégation des chromosomes dupliqués. Mais il y a encore plus important, la régulation de ces étapes est également hautement conservée, sans quoi, les conséquences peuvent être désastreuses.

Le système de contrôle du cycle cellulaire permet de retarder certains événements pour que certains autres aient le temps de s'accomplir. Par exemple, il ne permet pas la ségrégation des chromosomes avant que la duplication du génome soit complète. Les cellules doivent dupliquer leur masse, leurs organelles et leurs protéines en plus de leur génome afin que la cellule soit fonctionnelle suite à la division en deux cellules filles. Les cellules doivent donc coordonner leur croissance avec leur division.

En ce qui concerne les recherches sur le cycle cellulaire, beaucoup de découvertes proviennent des recherches sur la levure fissipare *Schizosaccharomyces pombe* et la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae*. Elles partagent beaucoup de similarités avec le cycle cellulaire des mammifères, elles se reproduisent presque aussi rapidement que des bactéries et la grosseur de leur génome est inférieure à 1% de celui des mammifères. Elles peuvent aussi proliférer en tant qu'organismes haploïdes, ce qui facilite la tâche quand vient le temps d'isoler et d'étudier des mutations géniques. La discussion suivante repose donc principalement sur nos connaissances du cycle cellulaire de ces deux espèces modèle.

1.1.2.1. Les phases du cycle cellulaire

Il y a deux événements principaux pendant le cycle cellulaire, soit la duplication du génome et la répartition des chromosomes dupliqués chez les deux cellules filles génétiquement identiques. La duplication a lieu pendant la phase S (pour Synthèse de l'ADN), qui dure plusieurs heures. Quant à la division cellulaire, elle s'opère pendant la phase M (pour Mitose), qui demande beaucoup moins de temps, typiquement moins d'une heure. La phase M comprend deux événements majeurs, la division nucléaire (ou mitose), durant laquelle les chromosomes sont distribués également chez les cellules filles, et la division cytoplasmique (cytocinèse) de la cellule mère en deux. Mentionnons que la discussion suivante se réfère à la mitose; la méiose, même si elle partage plusieurs des éléments régulateurs identiques, est différente parce qu'il y a deux phases M sans phase S intervenante.

Il est possible de distinguer plusieurs stades lors de la mitose à l'aide d'un microscope photonique. Au tout début, dans la prophase, les paires de chromosomes dupliqués sont condensés en bâtons que l'on appelle les chromatides sœurs. Pendant la prométaphase, l'enveloppe nucléaire disparaît et les chromosomes commencent à s'aligner au centre de la cellule à l'aide d'un réseau de microtubules et les moteurs protéiques tels que les dynéines et les kinésines. La métaphase a lieu quand l'alignement des chromosomes à la plaque équatoriale est terminé. Elle est la phase de la mitose qui dure le plus longtemps. À ce moment, les microtubules, provenant des deux pôles des fuseaux liés à un centrosome, s'attachent aux chromosomes, un sur chaque chromatide sœur. Pendant l'anaphase, les deux chromatides sœurs de chaque chromosome se sépareront pour migrer vers leur pôle respectif. Enfin, dans la télophase, l'enveloppe nucléaire se reforme autour des chromosomes et la cellule peut alors passer à la cytocinèse. Le temps entre deux mitoses, où on ne voit rien de spéciale dans l'apparence microscopique de la cellule, est appelé l'interphase.

Entre la phase M et la phase S, les cellules continuent de croître et doublent leur nombre d'organelles et de protéines. Ces intervalles constituent deux autres phases du cycle cellulaire; la phase G1 (gap phase), qui se situe entre la phase M et la phase S, et la phase G2, qui se situe entre la phase S et la phase M (Figure 1). Pour les cellules qui ne se divisent pas, on parle d'une phase G0; cette 4e phase se distingue des autres parce qu'elle représente une cellule à l'écart d'un cycle cellulaire normal.

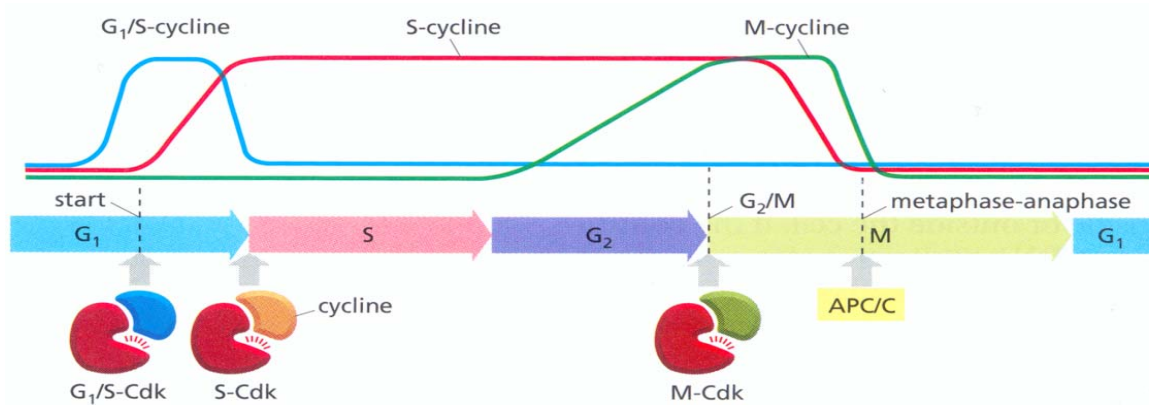


Figure 1. Oscillation des cyclines dans le contrôle du cycle cellulaire.

Il y a une oscillation pour 3 cyclines, chacune d'elle permet la régulation d'un point de contrôle du cycle cellulaire (G1/S, G2/M et métaphase/anaphase). *Figure inspirée de Alberts (2007)*⁵⁰

1.1.2.2. Transitions entre les phases

Les deux phases G sont importantes parce qu'elles permettent à la cellule d'avoir le temps de croître et de s'assurer que les conditions sont favorables pour la duplication de l'ADN ou de la mitose. Les passages d'une phase à une autre peuvent être régulés par des conditions extérieures ou par des signaux provenant d'une autre cellule. Ces points régulés sont appelés points de restriction et leur franchissement est irréversible.

Il y a trois différents points de restriction dans le cycle cellulaire, soit le passage de la phase G1 à S, de la phase G2 à M, et le passage de la métaphase à l'anaphase. Les éléments contrôleurs agissant aux différents points de restriction intègrent non seulement l'information sur l'état de la cellule, mais aussi plusieurs autres types d'information. Par exemple, la présence d'un signal externe spécifique peut aussi influencer la décision de franchir les points de restriction. Les points de restriction représentent donc des indicateurs de l'état de la cellule et de son environnement.

Les différents points de restriction sont strictement contrôlés par un ensemble de protéines régulatrices. Dans cet ensemble, les plus importantes protéines sont les kinases cycline-dépendante (CDK). Comme leur nom l'indique, leur activité est dépendante de leur liaison avec une cycline, qui non seulement active la kinase en lui permettant de phosphoryler ses substrats, mais joue aussi un rôle dans la sélection des substrats à phosphoryler. Les cyclines sont des protéines dont les niveaux à l'intérieur de la cellule varient selon le cycle cellulaire (d'où leur nom). La régulation des CDK s'étend aussi aux CAK (kinases activatrices des CDK) qui permettent à la CDK de maximiser son activité puisque la liaison avec la cycline n'active la CDK que partiellement. Il existe aussi les CKI (protéines inhibitrices des CDK) qui régulent négativement les CDK par liaison directe. La complexité de l'activation des CDK, soit par la présence d'une protéine activatrice, l'activation par phosphorylation et l'absence d'une protéine inhibitrice, permet de comprendre l'action intégrative de ces enzymes lors de leur passage à travers les points de restriction. Les principales cyclines et CDK des organismes les plus étudiés (vertébrés et levures) sont présentées dans le Tableau 1.

Après les CDK, les ubiquitines ligases doivent être considérées comme étant les protéines plus importantes. Ces protéines ajoutent l'ubiquitine à une protéine cible, permettant ensuite sa dégradation par le protéasome. Ces ubiquitines ligases sont responsables de la diminution des niveaux des cyclines. Il y a deux ubiquitine ligase importantes, le SCF (Skp/Cullin/F-box) et l'APC/C (Anaphase Promoting

Complex/Cytosome). Le complexe SCF est utilisé à la fin de la phase S, où la dégradation des cyclines de phase S a lieu. Le complexe APC/C est responsable de la dégradation des sécurines (l'inhibiteur de la séparase, l'enzyme qui coupe des liens entre les chromatides sœurs) et la dégradation des cyclines mitotiques.

Tableau I. Principales CDK et Cyclines retrouvées chez les vertébrés, *S. cerevisiae* et *S. pombe*

Complexe	Vertébrés		<i>S. cerevisiae</i>		<i>S. pombe</i>	
Cycline-CDK	Cyclines	CDK	Cyclines	CDK	Cyclines	CDK
G1-CDK	Cycline D	Cdk4, Cdk6	Cln 3	Cdk1	Cdc13	Cdc2
G1/S-CDK	Cycline E	Cdk2	Cln 1, 2	Cdk1	Cdc13	Cdc2
S-CDK	Cycline A	Cdk2, Cdk1	Clb5, 6	Cdk1	Cdc13	Cdc2
M-CDK	Cycline B	Cdk1	Clb 1, 2, 3, 4	Cdk1	Cdc13	Cdc2

1.1.2.3. Transition G1/S

Lors de l'initiation de la phase S, la cellule doit s'assurer qu'une taille minimale a été atteinte, que les signaux provenant de l'environnement sont propices et que l'ADN n'a pas été préalablement dupliqué. Pour assurer que la duplication du génome n'arrive qu'une seule fois, le complexe de préréplication (pre-RC) s'assemble à l'origine de réplication après la phase M. Le pre-RC est composé des protéines Cdc6, Cdt1 et six protéines MCM (Figure 2). Les origines de réplication sont des séquences d'ADN spécifiques dispersées sur les chromosomes où s'initie la réplication de l'ADN. Lorsque la phase S s'amorce, la CDK de la phase S phosphoryle les protéines formant le complexe pre-RC, ce qui a pour résultat le désassemblage du pre-RC et le recrutement du complexe de préinitiation qui initie la réplication de l'ADN (Figure 2). La dégradation de la protéine Cdc6 suite au

désassemblage du pre-RC empêche ce complexe de se reformer durant la suite du cycle cellulaire, car Cdc6 est synthétisé seulement pendant la phase G1.

Chez *S. cerevisiae*, il n'existe qu'une seule CDK, soit Cdc28 (ou Cdk1). C'est donc son association avec la cycline qui lui permet de sélectionner spécifiquement ses substrats⁵¹⁻⁵³. Pour entrer en phase S, la Cdc28p doit d'abord lier la cycline Cln3p. Cln3p est une protéine dont les niveaux sont modulés par les nutriments⁵⁴ et représentent une fraction constante de la masse de la cellule pendant la phase G1⁵⁵. Cette activation initiale permet d'assurer que la taille de la cellule est suffisante afin d'amorcer le cycle de division cellulaire⁵⁶.

Le complexe Cln3p-Cdc28p active deux facteurs de transcription appelés SBF (SCB-Binding Factor) et MBF (MluI cell-cycle Box Factor). L'activation de MBF semble directement due à la présence du complexe Cln3p-Cdc28p, tandis que l'activation de SBF est dépendante de la phosphorylation d'une protéine inhibitrice, la Whi5, par le complexe Cln3p-Cdc28p^{57, 58} (Figure 3). SBF induit l'expression des gènes *CLN1* et *CLN2* et le complexe composé de Cdc28p et de l'une des deux cyclines phosphoryle la CKI p40^{Sic1}, ce qui permettra sa dégradation par protéolyse via le complexe SCF^{Cdc4}. La dégradation de Sic1p libère les complexes Cdc28p/Cln5-6 qui vont alors phosphoryler une gamme de substrats. Entre autres, Cdc28p/Cln5-6 ciblent Sic1p, ce qui crée une boucle de rétroaction positive menant à une dégradation rapide et complète de Sic1p⁵⁹. Cdc28p/Cln5-6 comprend aussi, dans ses substrats, les protéines formant le complexe de préinitiation ORC, Cdt1, Cdc6 et Mcm. Cdc6 est phosphorylée et dégradée par protéolyse et Cdt est inactivée par la protéine geminin. Ces modifications permettront le recrutement de diverses protéines formant le complexe de préinitiation (Figure 2) qui rend possible l'initiation de la réplication de l'ADN chez *S. cerevisiae*⁶⁰.

1.1.2.4. Transition G2/M

La M-CDK agit dans le cycle cellulaire au début de la mitose pour induire l'assemblage des fuseaux mitotiques à partir des microtubules interphasiques, pour déclencher la condensation des chromosomes, et dans la plupart des cellules, pour initier la disparition de la membrane nucléaire et le réarrangement de l'appareil de Golgi⁶¹.

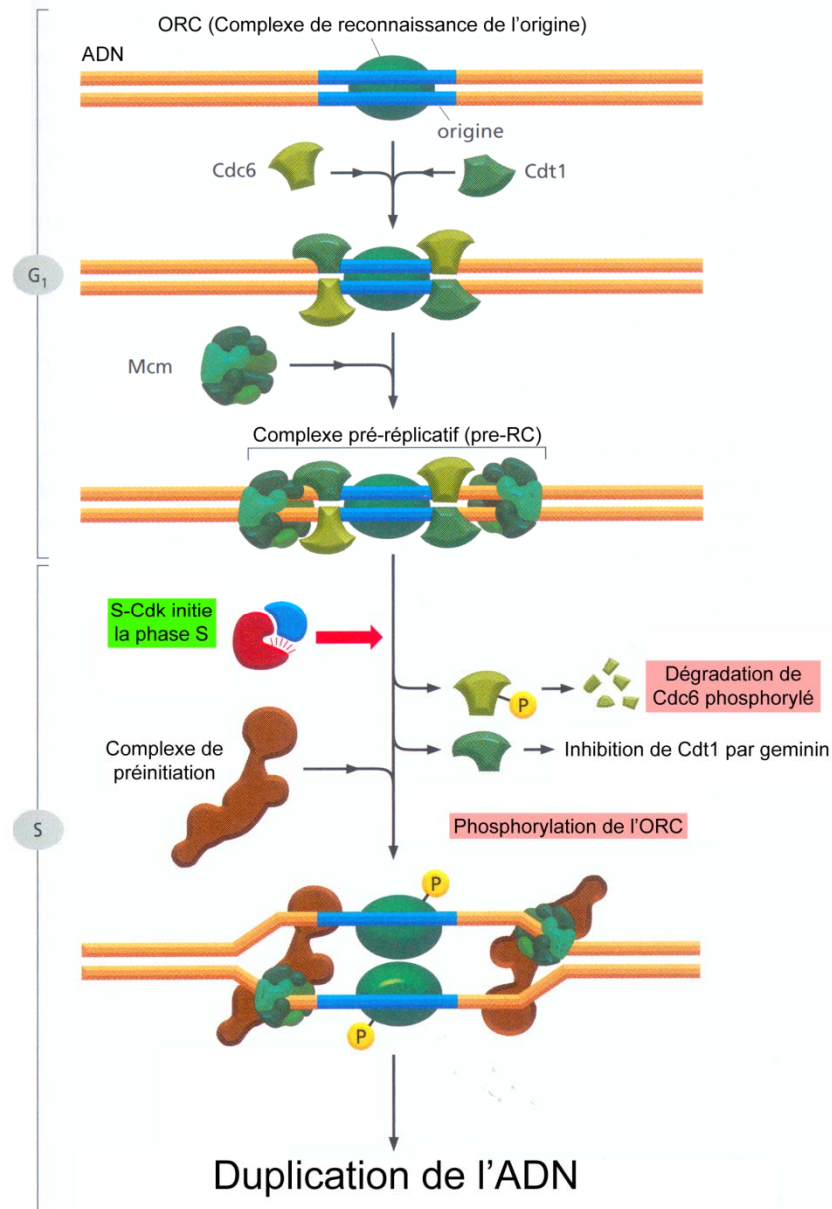


Figure 2. Contrôle de l'initialisation de la réplication de l'ADN.

L'ORC reste associé avec l'origine de réplication tout au cours du cycle cellulaire. Tôt en G₁, Cdc6 et Cdt1 viennent se lier de part et d'autre de l'ORC. Ce complexe peut alors recruter les protéines circulaires Mcm sur les brins d'ADN adjacents, formant le Complexe pré-réplicatif (pre-RC). Le

complexe S-CDK vient recruter d'autres protéines à l'origine, ce qui amène à la formation du complexe de préinitiation. Simultanément, le complexe S-CDK désassemble le pre-RC. Le complexe induit l'ubiquitination de la Cdc6 en le phosphorylant et induit aussi l'inactivation de l'ORC en le phosphorylant lui aussi. Cdt1 est inhibé par la protéine geminin, qui est une des cibles de dégradation du complexe APC/C, qui est inhibé en phase G1. Le complexe pre-RC ne peut se reformer que tard en G2, lorsque le complexe APC/C est actif et inhibe les CDK et permet la déphosphorylation de l'ORC. Cdt1 est aussi actif grâce à la dégradation de geminin par APC/C. *Figure inspirée de Alberts (2007)*⁵⁰

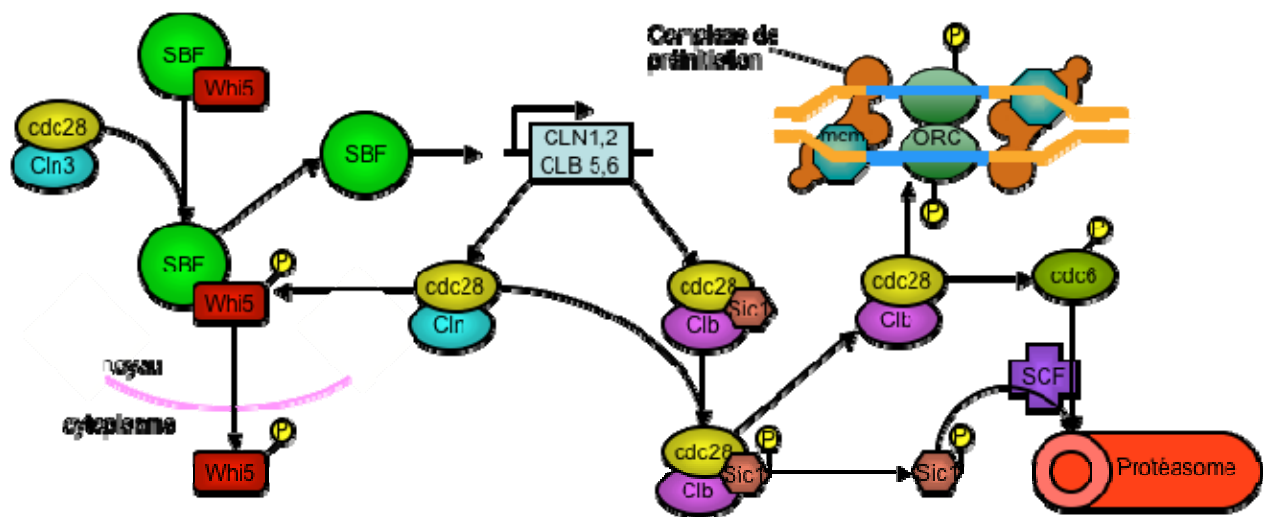


Figure 3. L'initiation de la duplication du génome régulée par les cyclines chez *S. cerevisiae*.

Lorsque la cellule atteint la taille critique, Cln3 est exprimée et s'associe avec Cdc28 afin de phosphoryler l'inhibiteur Whi5 du facteur de transcription SBF, ce qui mènera à son exportation dans le cytoplasme. SBF peut alors induire à son tour l'expression des cyclines Cln1 et Cln2.

Ces Cln, en complexe avec Cdc28, permettent elles aussi de phosphoryler Whi5, créant une boucle de rétroaction positive pour l'activation de SBF. D'autres cibles de SBF sont les cyclines Clb5 et Clb6. Elles s'associent aussi avec Cdc28, mais leurs complexes sont inactivés par p40^{Sic1}, une CKI. p40^{Sic1} est phosphorylée par le complexe Cdc28/Cln1-2, ce qui mènera à sa dégradation par la voie de l'ubiquitination. Le complexe Cdc28/Cln5,6 va alors phosphoryler les ORC et Cdc6, ce qui permettra le recrutement du complexe de pré-initiation et ainsi, la réplication de l'ADN. *Figure inspirée de Bloom & Cross (2007)⁶² et de Alberts (2007)¹*

L'activation de la M-CDK nécessite d'abord l'augmentation de la M-cycline (Cycline B chez les vertébrés) au dessus d'un seuil critique. La M-cycline est synthétisée constamment tout au long du cycle cellulaire, et son augmentation pendant les phases G2 et M semble être due à des altérations dans la vitesse de dégradation⁶³. L'activation du complexe M-CDK-Cycline nécessite conjointement la phosphorylation du résidu Thr161 par une CAK⁶⁴ et le retrait d'un phosphate inhibiteur sur le résidu Tyr15 par la phosphatase Cdc25p⁶⁵. Ce phosphate inhibiteur est maintenu par la kinase WEE1^{66, 67}, et l'activation de la M-CDK dépend donc de la balance des activités WEE1p et Cdc25p. WEE1 et Cdc25p sont aussi des cibles de la M-CDK active, formant une boucle de rétroaction positive qui permet une augmentation abrupte et irréversible de l'activité de la M-CDK⁶⁸.

1.1.2.5 Transition métaphase/anaphase

Les chromatides sœurs formées par la réplication d'ADN pendant la phase S sont liées ensemble par des complexes protéiques nommés cohésines. Ces structures doivent être dissociées lors de l'anaphase pour que chaque chromatide migre vers son pôle respectif. L'enzyme nécessaire pour la dissociation est la séparase, une protéase dont le substrat est la cohésine. La séparase est normalement tenue inactive par un inhibiteur, la sécurine, et

l'activation de la séparase dépend de la dégradation de la sécurine via l'ubiquitine ligase APC/C-Cdc20. L'activation de l'APC/C est donc l'élément dans cette transition. Il semble que le complexe APC/C a besoin de lier la Cdc20p pour reconnaître la sécurine, et que la Cdc20p ne lie que l'APC/C phosphorylé par la CDK mitotique⁶⁹.

La dissociation des deux chromatides sœurs permet aux microtubules provenant des deux pôles des fuseaux de tirer des chromosomes vers les pôles. Étant donné l'importance de cette étape, un système de vérification appelé le SAC (spindle-assembly checkpoint) assure l'attachement des microtubules aux kinétochores sur les chromatides sœurs. Ce mécanisme permet de bloquer l'anaphase si l'attachement n'a pas eu lieu correctement. Le SAC comprend un complexe de protéines qui assure que la Cdc20p est inhibée si les kinétochores ne sont pas liés aux microtubules. Le mécanisme de l'inhibition de Cdc20 n'est pas compris, mais il faut se rappeler que sans Cdc20p, l'APC/C ne peut pas être activée⁷⁰.

Finalement, le complexe APC/C-Cdc20p a aussi comme substrat les M-cyclines, qui seront aussi dégradées par ubiquitination. Cette dégradation élimine complètement l'activité de la CDK, ce qui permettra aux pre-RC de venir se former aux origines de réplication afin de préparer la cellule pour un nouveau cycle cellulaire⁷¹.

1.2.2. Composants importants de la régulation du cycle cellulaire

L'élément clé dans le contrôle du cycle cellulaire est la kinase cycline dépendant (CDK) puisque ces kinases activent les protéines responsables de la réplication de l'ADN pendant la phase S et de la division cellulaire. Par contre, il y a trois autres familles de protéines qui sont impliquées dans la régulation de la CDK de la phase M. La première famille est celle des cyclines, sans lesquelles les kinases ne sont pas actives. Par la suite il y a des enzymes qui modulent l'état de phosphorylation, tels que les kinases et les phosphatases. Tout dernièrement il y a des inhibiteurs de la CDK, appelé les CKI. Ces trois

classes de protéines sont aussi importantes puisqu'elles permettent une régulation fine de la CDK.

1.2.2.1. CDK

Les CDK sont la pierre angulaire du contrôle du cycle cellulaire chez les eucaryotes. Par contre, leur nombre, leurs substrats et leurs rôles précis peuvent varier d'une espèce à l'autre. Par exemple, dans les levures bourgeonnantes *S. cerevisiae*, il y a trois CDK dont seulement une seule contrôle l'ensemble des transitions du cycle cellulaire en s'associant à différentes cyclines (Cdc28). Chez la levure fississipare *S. pombe*, il n'y a qu'une CDK, la Cdc2⁷². Chez les eucaryotes supérieurs, deux CDK appelés Cdk1 (parfois Cdc2) et Cdk2, contrôlent le cycle cellulaire avec des fonctions homologues à Cdc2 (Tableau I).

La structure tridimensionnelle de la CDK a été déterminée par des études de cristallographie aux rayons X⁷³. La CDK possède deux domaines, un grand domaine C-terminal, et un petit domaine N-terminal, et l'ATP se lie dans la jonction de ces deux domaines. La protéine native est inactive, principalement parce qu'une boucle flexible sur le domaine C-terminal (T loop) bloque le site actif. Il y a aussi un motif conservé sur le domaine N-terminal, appelé PSTAIRE (d'après les acides aminés qui s'y trouvent), qui est indispensable pour la liaison avec les cyclines.

La première et la plus importante des modifications qui permettent l'activation des CDK est l'interaction avec une sous-unité de la cycline. La liaison entre les deux protéines se fait principalement par la liaison entre le domaine PSTAIRE de la CDK et une région conservée de la cycline appelée « boîte cycline ». La liaison avec la cycline provoque un changement de conformation majeur dans le domaine C-terminal de la kinase, et en particulier dans la boucle T, qui se déplace et libère ainsi le site actif de la CDK. Les substrats de la CDK peuvent alors venir s'insérer et être phosphorylés⁷³, même si la liaison avec la cycline ne fait qu'activer partiellement la CDK.

L'activation complète de la CDK a lieu lorsque le résidu Thr160 (situé sur la boucle T) est phosphorylé⁷⁴. Cette phosphorylation provoque un changement de conformation de la boucle T, qui ouvre davantage le site actif. En plus, le phosphate agit comme élément central pour un réseau de ponts hydrogènes qui stabilisent les interactions entre la CDK et la cycline. Cette phosphorylation augmente l'activité de la CDK de 80 à 300 fois⁷⁵.

Les inhibiteurs des CDK (CKI) représentent un autre mécanisme de contrôle des CDK. Les inhibiteurs, tels que la p27, se lient avec le complexe de la kinase et de la cycline^{74, 76} et la région C-terminale de la p27 s'inverse dans le site de liaison avec l'ATP bloquant ainsi le site. Il existe une variété de CKI qui sont pour la plupart utilisées lors de la phase G1 ou S. Elles se lient toutes au complexe cycline-CDK et bloquent le site actif de la CDK (voir 1.2.2.5).

Le dernier mécanisme qui contribue à la régulation des CDK implique une phosphorylation inhibitrice sur la Tyr15 (et Thr14 pour les eucaryotes multicellulaires) de la CDK. Ces résidus se trouvent sur une boucle riche en glycine qui forme la base du site de liaison de l'ATP^{73, 77}. Ils sont disponibles pour cette phosphorylation seulement après la liaison avec la cycline et ceci est le mécanisme utilisé pour l'inhibition de la Cdc2 par WEE1 (voir section 1.2.2.4).

1.2.2.2. Cyclines

Comme leur nom l'indique, les cyclines ont originalement été identifiées comme étant des protéines dont l'abondance varie pendant le cycle cellulaire⁷⁸, même si au cours des recherches subséquentes il a été démontré que ce ne sont pas toutes les cyclines qui possèdent un cycle de synthèse et de dégradation dépendant du cycle cellulaire. Par contre, elles présentent toutes une région homologue appelé la boîte cycline⁷⁹, nécessaire pour l'interaction avec une CDK.

Dans la levure *S. cerevisiae*, il existe 22 cyclines, dont neuf (Clb1-6 et Cln1-3) qui s'associent à Cdc28p (Figure 3), la seule CDK essentielle au cycle cellulaire. Les cyclines

Cln1-3 sont nécessaires pendant la phase G1 et le premier point de restriction, qui comprend la duplication du centrosome, le bourgeonnement, l'initiation de la synthèse de l'ADN et la répression de la voie de signalisation pour la conjugaison⁸⁰.

Les cyclines de type B (Clb1 à Clb4) sont responsables de la régulation de la phase M. Leur niveau d'expression maximale est atteint après ceux de Clb5 et Clb6. Le mécanisme permettant aux différentes cyclines de diriger la CDK vers des substrats distincts commence à être compris. Loog & Morgan (2005) ont testé la différence d'activité entre 150 substrats de Cdc28 lorsque ce dernier est lié avec soit Clb5 ou Clb2. Clb5 possède une moins grande affinité pour lier Cdc28 que Clb2, mais par contre, Clb5 procure une plus grande spécificité des substrats après sa liaison à Cdc28. La spécificité de l'interaction entre ces substrats et la Clb5 dépend d'une poche hydrophobe sur la cycline et d'un motif RXL chez les substrats. En ce qui concerne Cdc28/Clb2, aucun substrat spécifique n'a été identifié. Par contre, le complexe démontre une activité intrinsèque plus grande que Cdc28/Clb5, ce qui lui permet de phosphoryler un plus grand nombre de protéines⁸¹. On peut donc affirmer que la sélection des substrats pour la phase S et la phase M se fait de deux façons différentes.

Curieusement, chez la levure *S. pombe*, il existe une seule cycline essentielle, Cdc13 (Tableau 1). C'est donc dire qu'un seul complexe CDK/cycline peut engendrer la phase S et la phase M. La stratégie chez *S. pombe* est de modifier l'activité du complexe Cdc2/Cdc13 au cours des différentes phases. L'activité du complexe est basse en G1 et atteint un niveau suffisamment élevé à la phase S, ce qui permet la réplication de l'ADN. Puis le complexe atteint une activité maximale pour que la mitose ait lieu et il est dégradé par la suite pour que le cycle puisse recommencer⁷².

1.2.2.3. WEE1 et Cdc25

Le point de contrôle d'entrée en phase M doit être régulé de façon rigoureuse au niveau de la cycline B, parce que la Cdk1 n'est pas active sans elle. Par ailleurs,

l'accumulation de la cycline est graduelle à travers la phase G2, tandis que l'entrée en phase M est abrupte. Cette différence s'explique par la présence de plusieurs boucles de rétroaction dans le mécanisme d'activation de la kinase. Bien que la formation du complexe Cdk1/cycline B soit en parallèle avec la synthèse de la cycline B, il est gardé inactif par la phosphorylation de la CDK sur la Tyr15. Cette phosphorylation est effectuée par la kinase Myt1 (chez *S. cerevisiae*) ou WEE1 (chez *S. pombe*). Le phosphate sur la Tyr15 est enlevé par la phosphatase Cdc25p. Lorsqu'arrive la transition G2/M, non seulement la Cdk1 est activée par la phosphatase Cdc25, mais la Cdc25p est activée par la Cdk1 (Figure 4). En plus, la CDK active phosphoryle et inactive WEE1⁸². Ceci constitue une boucle de rétroaction positive entre Cdc25, WEE1 et la Cdk1, et assure que l'activation est unidirectionnelle : une fois qu'elle est enclenchée, il est impossible de l'arrêter (Figure 4)⁸².

La phosphatase Cdc25 et la kinase WEE1 sont toutes les deux des substrats pour une classe de kinase appelée les « kinases checkpoint » ou Chk. Par exemple, la phosphatase Cdc25 est gardée inactive pendant l'interphase par une phosphorylation sur le résidu Ser287. Cette phosphorylation, catalysée entre autre par Chk1/Chk2, lui permet de se lier à la protéine 14-3-3 et d'être séquestrée dans le cytoplasme⁸³. En contraste à cette inhibition, les kinases WEE1 et Myt1 sont activés par les Chk1/Chk2. Ces deux réactions agissent de concert afin d'empêcher l'activation du complexe CDK/cycline par ce contrôle réciproque de Cdc25 et de WEE1. Les Chk sont activées suite à une réplication incomplète de l'ADN ou encore lorsqu'il est endommagé.

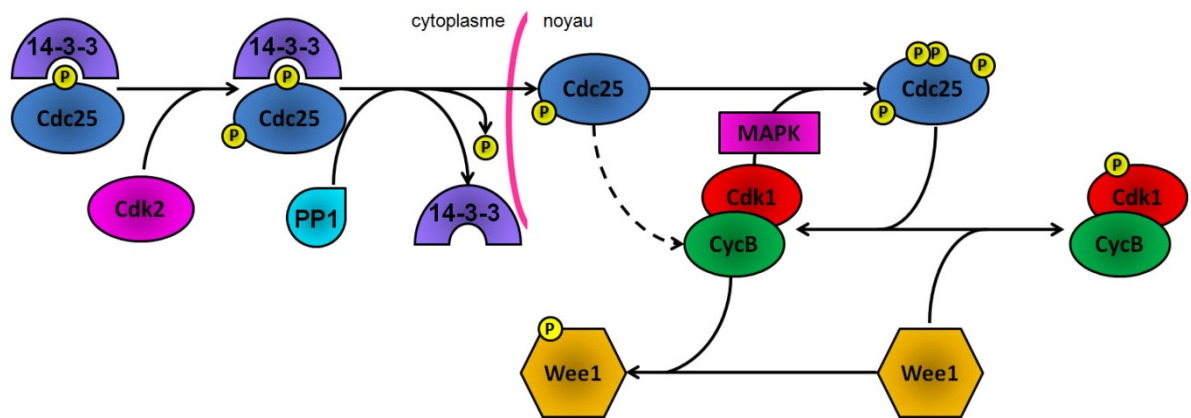


Figure 4. La régulation du complexe Cdk1/CyclineB par Cdc25 et WEE1 chez *S. pombe*.

Avant la transition G2/M, Cdc25p est séquestré dans le cytoplasme, tandis que WEE1 est dans le noyau. Lorsque des complexes Cdk1/CycB sont formés, ils sont aussitôt inactivés par WEE1. C'est Cdk2, en phosphorylant Cdc24 sur la Thr138, qui commence la réaction en chaîne qui va mener à l'activation du complexe Cdk1/CyclineB. Suite à cette phosphorylation, 14-3-3 relâche Cdc25, PP1 déphosphoryle alors Cdc25 sur la Ser287, ce qui lui permet de ne plus être reconnu par 14-3-3. Cdc25 est alors importé dans le noyau et va enlever le phosphate inhibiteur de la Cdk1, ce qui entraîne une double réaction en chaîne. Premièrement, le complexe va entraîner des phosphorylations multiples sur Cdc25 pour augmenter son activité. Deuxièmement, Cdk1 va inhiber WEE1. Ces deux boucles de rétroaction permettent une activation rapide et irréversible du complexe Cdk1/CycB

Figure inspirée de Takizawa (2000)⁸⁴ et de Perry (2007)⁸²

1.2.2.4. CKI

Les complexes CDK/cycline sont aussi régulés par des inhibiteurs de kinases cycline dépendante (CKI). Ils assurent que les CDK ne sont pas activés prématurément, ou bien que l'activité des CDK ne dure pas trop longtemps. Chez *S. cerevisiae*, il y a trois CKI : Far1, qui inhibe les complexes Cdc28/Cln1-3⁸⁵, Sic1 qui inhibe les complexes Cdc28/Clb1-6 (Figure 3)⁸⁶, et Pho81 qui inactive Pho85-Pho80⁸⁷. La CKI Far1 n'est pas requise pour la progression du cycle cellulaire, mais elle est nécessaire pour l'arrêt du cycle cellulaire et pour la différenciation en réponse aux phéromones de la conjugaison⁸⁸. Pho81 inhibe les complexes CDK/cycline qui contrôlent l'expression des gènes lorsqu'il y a peu de phosphates dans le milieu⁸⁹.

Chez *S. cerevisiae*, le rôle principal de Sic1 est d'empêcher une initiation prématurée de la phase S. Sic1p séquestre les complexes Cdc28/Clb5-6 jusqu'à ce que les niveaux de Cln1-3 soient assez élevés pour permettre au complexe de phosphoryler Sic1 pour qu'il soit dégradé par protéolyse par la voie de l'ubiquitination via le complexe SCF^{Cdc4} 90.

Chez *S. pombe*, la CKI p25(Rum1) joue un rôle similaire à Sic1, malgré l'absence de toute similarité de séquence, en inhibant l'activité kinase avant l'entrée de la phase S pour permettre à la levure d'atteindre une taille minimale pour entrer en mitose⁹¹. Comme pour Sic1, la protéolyse de p25 se fait par ubiquitination, parce que les niveaux de p25 sont constants dans une levure dont une composante du protéasome est mutée⁹². La stabilité de l'ARNm de p25 est régulée et augmente en réponse au manque de nutriments⁹³.

Dans les cellules de mammifères, il y a deux classes de CKI, les Cip/Kip, (p21, p27 et p57) qui inhibent les Cdk2,4,6 impliquées dans le contrôle de la phase G1 et G1/S, et la classe Ink4 (p15, p16, p18 et p19), qui est spécifique aux complexes Cdk4-6/cycline D⁹⁴. Bien qu'il n'y ait pas de séquence homologue entre les CKI des mammifères et celles des

levures *S. cerevisiae* et *S. pombe*, la structure d'un domaine inhibiteur est conservé entre Sic1 et Kip1⁹⁵, et l'on dénote des similarités de structure entre Pho81 et Ink4⁹⁶.

1.2.3. Processus importants dans la régulation du cycle

Dans le cycle cellulaire, il est important que tous les mécanismes soient fonctionnels et qu'ils s'enchaînent de façon cohérente, car sans cela, les conséquences peuvent être catastrophiques. Le cancer par exemple résulte d'un dysfonctionnement du cycle cellulaire et survient lorsqu'une cellule se divise de façon anormale (et produit ainsi une multitude de clones). C'est pourquoi il existe de la redondance au niveau de certaines fonctions clés du cycle cellulaire afin de permettre à la cellule de progresser normalement lorsqu'une protéine ne peut plus remplir sa fonction. La régulation du cycle cellulaire se fait de multiples façons : la transcription, la dégradation et la localisation.

1.2.3.1. Transcription

Une grande distance phylogénétique sépare les deux levures *S. cerevisiae* et *S. pombe*, mais la périodicité de la transcription en fonction du cycle cellulaire est quand même conservée. L'étude du génome de ces deux organismes a permis d'identifier des centaines de gènes exprimés périodiquement. Il existe trois vagues principales d'expression pour ces gènes qui correspondent à l'initiation de la réplication de l'ADN, à l'entrée et à la sortie de la mitose⁹⁷. Chez la levure, les facteurs de transcription responsables de l'expression des gènes pour la première vague pendant la transition G1/S sont SBF (SCB-binding factor) et MBF (MluI cell-cycle box binding factor). Les deux complexes sont des hétérodimères qui possèdent une sous-unité régulatrice en commun, Swi6p. Par contre, la sous-unité de la liaison avec l'ADN, Swi4p pour SBF et Mbp1p pour MBF, est différente, ce qui explique la différente gamme de gènes contrôlés par les deux complexes⁹⁸. SBF et MBF se lient à l'ADN au début de la phase G1, tandis que l'ARN polymérase II n'est recrutée au promoteur qu'à la fin de la phase G1, suite à l'activation de Cdk1/Cln3⁹⁹. Entre temps, la protéine Whi5p empêche l'initiation de la transcription en

s'associant aux facteurs de transcription. L'exportation nucléaire de Whi5p est régulée par sa phosphorylation par la CDK, qui a lieu à la fin de la phase G1⁵⁷. Les gènes *Clb1-2* font parti des cibles des facteurs de transcription SBF et MBF, et il est intéressant de noter que l'activité des deux facteurs de transcription est inhibée rétroactivement par CDK/Clb1-2¹⁰⁰.

Les sites de liaison génomiques de MBF et SBF ont tous été répertoriés grâce à des micropuces à ADN¹⁰¹. Ces études ont permis d'identifier 200 nouveaux sites de liaison potentiels. Bien que les deux facteurs de transcription aient parfois des cibles redondantes, SBF cible plus particulièrement les gènes impliqués dans le bourgeonnement et la synthèse de la membrane et de parois cellulaires, tandis que MBF se lie préférentiellement aux promoteurs des gènes impliqués dans la réparation et la synthèse de l'ADN. Bien qu'ils lient environ 300 promoteurs, il y a peu de ces gènes qui ont une expression maximale à la transition G1/S¹⁰². Ceci s'explique par le fait que parmi les cibles de SBF se retrouvent aussi des sites pour au moins neuf autres facteurs de transcription.

Chez *S. pombe*, une dizaine de séquences promotrices cibles de MBF ont été identifiées ainsi qu'une douzaine d'autres sites potentiels. Elles sont principalement impliquées dans la réplication de l'ADN et le contrôle du cycle cellulaire¹⁰³. Les gènes pour la formation de la membrane et de la paroi cellulaire n'en font pas parti, ce qui pourrait être expliqué par la différence du cycle cellulaire entre les deux organismes et l'absence du facteur de transcription SBF chez la levure fissipare⁹⁷. Mais il reste évident qu'il y a beaucoup moins de gènes régulés par le facteur de transcription MBF dans *S. pombe* par rapport à *S. cerevisiae*¹⁰⁴.

L'étude d'expression de gènes cycliques pour la transition G2/M (la deuxième vague) a commencé avec l'identification du facteur de transcription Mcm1p, qui se lie aux promoteurs en complexe avec les protéines de la famille "forkhead" Fkh1/2p^{97, 105, 106}. Ces facteurs de transcription reconnaissent des sites de liaison spécifiques dans les promoteurs de gènes et y restent liés tout au long du cycle cellulaire. L'activité périodique de la transcription dans le cycle cellulaire dépend aussi de l'activité d'un autre composant du

complexe, la protéine Ndd1p¹⁰⁷. Ndd1p est essentielle pour la progression entre la phase G2 et la phase M et pour l'expression des gènes spécifiques à la phase M. L'activité de Ndd1p est régulée par sa transcription et sa dégradation protéique, et le niveau maximum de Ndd1 se trouve dans la phase G2. La liaison entre Ndd1p et les autres facteurs de transcription est aussi influencée par phosphorylation, spécifiquement la phosphorylation de Fkh1 par la Cdk1/Clb1-2. L'expression des gènes de la transition G2/M est accentuée par le fait que le promoteur des cyclines Clb1-2 possède un site de reconnaissance pour le complexe Mcm1p-Fkh2p-Ndd1p, formant ainsi une boucle de rétroaction positive¹⁰⁸. L'inhibition de Mcm1p se fait par la protéine Yox1p, qui est activée par SBF⁹⁷. Cette répression permet un arrêt de la transcription des gènes spécifiques de la mitose lorsque la transition M/G1 est franchie.

Dans la troisième vague de transcription, il y a l'activation des gènes pour la transition M/G1 par les facteurs de transcription Swi5 et Ace2 chez *S. cerevisiae*¹⁰⁹. La stimulation de l'expression des gènes SWI5 et ACE2 se fait pendant la transition G2/M par le complexe Mcm1-Fkh2-Ndd1p lors de l'entrée en phase M. Leur régulation se fait au par phosphorylation, ce qui explique que leur expression ne correspond pas à leur activité. Cdk1/Clb2 régule négativement Swi5 en la phosphorylant, ce qui la séquestre à l'extérieur du noyau où elle s'accumule¹¹⁰. À l'inverse, Ace2 est régulé positivement par phosphorylation à la fin de la mitose dans la cellule fille¹¹¹. Une de leurs cibles, le facteur de transcription Ash1p, permet de différencier l'identité de la cellule fille et de la cellule mère. En effet, l'ARNm de Ash1p est séquestré dans la cellule fille et, lorsque traduit, contrôle l'expression des gènes spécifiques pour la cellule fille¹¹². Chez la cellule fille, Ace2 contrôle aussi le passage à la phase G1¹¹³.

Chez les métazoaires, les facteurs de transcription E2F sont très importants puisqu'ils régulent l'expression des gènes pour la transition G1/S¹¹⁴. Comme chez la levure, la protéine Rb (Retinoblastoma protein) permet l'inactivation de la transcription en s'associant à E2F-1, E2F-2 et E2F-3 tôt en G1¹¹⁵. Plus tard dans la phase G1, Rb est

phosphorylé par les complexes Cdk4-6/Cycline D, ce qui permet de libérer les E2F. E2F débute alors la transcription des gènes nécessaires pour la transition à la phase S, dont la cycline E. Le complexe Cdk2/Cycline E contribue aussi à l'inactivation de Rb, ce qui crée une boucle d'inactivation afin que la transition pour la phase S se fasse rapidement¹¹⁶. Bien qu'il n'y ait pas de séquences homologues, Rb semble avoir le même rôle en inactivant E2F que la protéine Whi5, qui inhibe les facteurs de transcription SBF et MBF⁵⁷ avant l'entrée en phase S.

1.2.3.2. Dégradation

Les cyclines et les CKI sont reconnues pour le rôle qu'elles ont à jouer en tant que protéines régulatrices de CDK dans le cycle cellulaire. Lorsqu'elles ne sont plus requises, elles sont dégradées par ubiquitination. Dans la voie de l'ubiquitination, il y a trois protéines importantes : E1 (Ubiquitin-activating enzyme), E2 (Ubiquitin-conjugating enzyme) et E3 (Ubiquitin-ligase). E1 est responsable du recrutement de l'ubiquitine, et la transfère spécifiquement à E2. E3 se fixe aux signaux spécifiques des substrats et forme un complexe avec E2, ce qui permet l'ajout d'une chaîne de polyubiquitines sur la protéine cible sans que le complexe E2-E3 ne se dissocie de la protéine. SCF (SKP1-CUL1-F-box-protein) et APC/C (anaphase-promoting complex/cytosome) sont les deux complexes ubiquitine ligase et sont responsables de la reconnaissance de substrats spécifiques dans le contrôle du cycle cellulaire.

Pourquoi la cellule détruit-elle les différentes cyclines à différents temps de la mitose? L'hypothèse généralement acceptée est que les différentes cyclines contribuent à la sélection des substrats pour la phosphorylation par la CDK, et que ces substrats sont déphosphorylés quand la cycline est dégradée. Par exemple, les substrats de la cycline A doivent être déphosphorylés avant l'anaphase, donc plus tôt que ceux de la cycline B, pour un bon déroulement du cycle cellulaire. Les dégradations doivent suivre un certain ordre pour que les différents événements de la mitose aient lieu⁷¹.

Bien que les complexes SCF et APC/C soient similaires au niveau structural, leurs fonctions cellulaires sont différentes. Cette différence est observée par la synchronisation de leurs activités avec le cycle cellulaire. L'APC/C est actif à partir de l'anaphase jusqu'à la fin de la phase G1, tandis que SCF, qui a un important rôle à jouer pour la transition G1/S, est actif tardivement en G1 jusqu'en début de mitose⁶³. La spécificité des ubiquitines ligases est conférée, au moins en partie, par des protéines F-box formant partie du complexe. Les F-box présentent chez les métazoaires ainsi que leurs cibles sont inscrites dans la Figure 5⁶³.

Durant l'anaphase, les kinétochores séquestrent l'activateur Cdc20 pour garder le complexe APC/C inactif⁷⁰. Lorsque chacun des kinétochores est lié par un microtubule, la Cdc20p est libérée et le complexe APC/C^{Cdc20} est alors actif. L'APC^{Cdc20} permet la ségrégation des chromosomes en dégradant la sécurine, qui agit normalement pour inhiber la séparase. La séparase active dégrade les cohésines qui fixaient les chromatides sœurs l'une à l'autre¹¹⁷. Les autres cibles principales du complexe APC^{Cdc20} sont les cyclines mitotiques A et B. La dégradation de ces cyclines inactive les CDK, ce qui entraîne la fin de mitose, la cytokinèse et la formation du complexe de pré-réplication. Le complexe APC/C peut aussi s'associer à Cdh1. Cette protéine est, contrairement à Cdc20, inactivée par la phosphorylation de Cdk1. Donc en dégradant les cyclines associées à Cdk1, le complexe APC/C^{Cdc20} permet l'activité du complexe APC/C^{Cdh1}.

L'efficacité de l'ubiquitination par le complexe APC/C est définie en partie par l'affinité du complexe avec son substrat. La chaîne d'ubiquitines s'accumulera plus lentement sur le substrat avec une moins grande affinité, et sa dégradation sera par conséquent plus lente⁷¹. Ce phénomène s'observe bien chez *S. cerevisiae*. Le complexe APC/C^{Cdc20} permet la dégradation totale de Clb5, tandis que les niveaux de Clb2 ne sont que partiellement réduits et le complexe APC/C^{Cdh1} est nécessaire pour la protéolyse complète de Clb2. Dans les cellules animales, certains des substrats du complexe APC/C sont dégradés pendant la prométaphase (cycline A), alors que d'autres ne sont dégradés que

pendant la métaphase (Cycline B et sécurines). En plus, la dégradation des différents substrats du complexe APC/C^{Cdh1} n'est pas simultanée, mais suit aussi un certain ordre. Cdc20 est dégradé en premier, suivi par Plk1, Aurora A et finalement Aurora B⁷¹. Une étude récente a démontré que la vitesse de l'ubiquitination *in vitro* de Cdc20, Plk1 et Aurora A correspond à leur ordre de dégradation¹¹⁸.

Il y a cinq F-box pouvant former le complexe SCF, soit Skp2, Grr, Fbw7, cdc4 et β -TrCP.¹¹⁹ La protéine Skp2 est active pendant la phase G1. Elle est responsable de la liaison avec beaucoup de substrats (Figure 5)¹²⁰. Nayamaya K. & al. (2000)¹²⁰ ont proposé que la cible principale de SCF^{Skp2} est p27, une CKI responsable de l'arrêt du cycle cellulaire lorsque l'ADN est endommagé. Par contre, des études récentes démontrent que ce n'est pas le cas, puisque p27 est séquestré dans le cytoplasme et que Skp2 demeure dans le noyau. En plus, la dégradation de p27 a lieu pendant la phase G1 tandis que Skp2 n'est exprimé qu'au début de la phase S¹²¹. Les deux cibles principales du complexe SCF-Fbw7 sont Myc et la cycline E. Myc est un facteur de transcription permettant l'expression de la cycline D qui, après son association avec la CDK, permettra à son tour l'activation du facteur de transcription E2F en phosphorylant et inhibant Rb. Les deux cibles de la F-box β -TrCP ont un rôle critique dans la régulation du cycle cellulaire. L'une des cibles est la phosphatase Cdc25, qui permet l'activation de la Cdk1¹²², et l'autre est Emi1, qui séquestre Cdc20 avant son interaction avec le complexe APC¹²³. La cdc4 permet la dégradation de Sic1 et de Far1, des CKI qui doivent être inactivées avant l'entrée en phase S, tandis que Grr permet au complexe de cibler les cyclines G1/S.

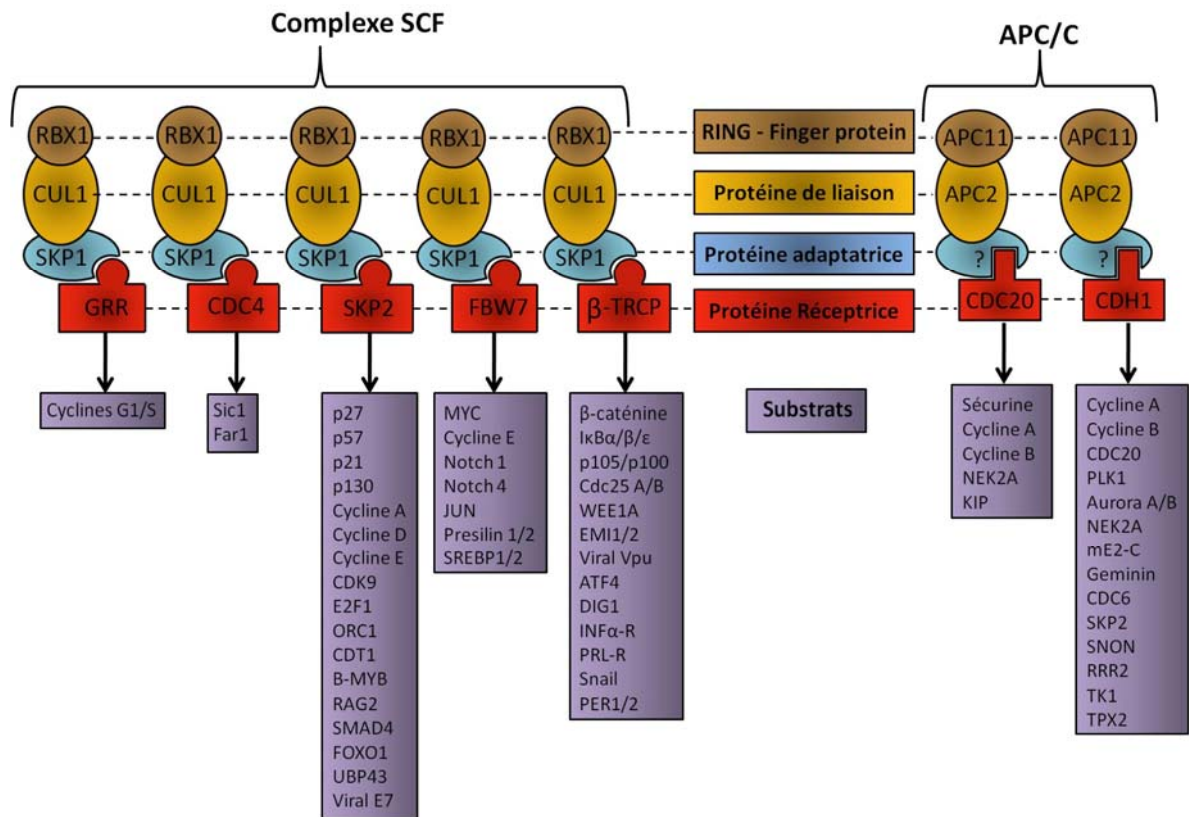


Figure 5. Structure des complexes de dégradation SCF et APC/C.

Les complexes SCF et APC/C sont constitués de protéines fixes et variables. Les protéines invariables du complexe SCF sont RBX1, CUL1 et SKP1. C'est la protéine responsable de la spécificité des substrats (F-BOX) qui varie entre Grr, Cdc4, SKP2, FBW7 et β -TRCP qui permettent le contrôle du cycle cellulaire au niveau de la phase S. Le complexe APC/C est constitué des protéines invariables APC11, APC2 et de 11 autres composants moins bien compris. Il a aussi les protéines variables CDC20 et CDH1 qui permettent la reconnaissance de différentes protéines cibles du cycle cellulaire. Les protéines cibles des différents complexes sont aussi indiquées (mauve). *Figure inspirée de Nakayama & Nakayama (2006)*⁶³

1.2.3.3. Localisation des composants

La plupart des réactions biochimiques du cycle cellulaire se passent dans le noyau. Certaines protéines régulatrices utilisent cette particularité afin de synchroniser les événements du cycle cellulaire. Entre autres, Swi5 est séquestré par phosphorylation à l'extérieur du noyau¹²⁴, et plusieurs études ont démontré que la localisation de la cycline B change au cours du cycle cellulaire¹²⁵⁻¹²⁷. La cycline B1 est gardée à l'extérieur du noyau, avant de former un complexe avec la Cdk1, grâce un NES (signal d'export nucléaire) situé entre les résidus 108 et 117¹²⁸. Il est donc possible que la cycline B n'induisse pas la phase S parce qu'elle n'est pas dans le même compartiment que les substrats. Pour déterminer si la cycline B peut induire la phase S en présence des substrats, Moore & al. (2008) ont créé une cycline B sans le NES et ont inclus un signal d'importation nucléaire (NLS) à l'extrémité N-terminale pour accélérer l'importation dans le noyau. Ces chercheurs ont trouvé qu'en éliminant 90% de la cycline E endogène et en ajoutant une concentration spécifique de la protéine de fusion, la réplication de l'ADN pouvait encore avoir lieu. La localisation de la cycline B semble donc très importante pour la garder hors d'atteinte des substrats régulant l'entrée en phase S¹²⁹.

Alors, si la cycline B ne possède pas de NLS et seulement un NES, par quel mécanisme peut-elle se retrouver dans le noyau pour accomplir son rôle dans la mitose? Ce mécanisme semble impliquer la formation d'un complexe avec la protéine transporteuse importine- β seulement¹³⁰. Normalement, l'importine- α est aussi requise pour la reconnaissance de la protéine qui va être importée dans le noyau. De plus, le mécanisme d'importation implique la phosphorylation de quatre résidus sérines dans la région du NES, que reconnaît normalement Crm1, un récepteur d'export nucléaire¹³¹. Si ces sérines sont mutées pour des acides glutamiques (pour simuler la phosphorylation), la cycline B1 demeure continuellement dans le noyau et n'est plus exportée par Crm1. Par contre, quand les quatre sérines sont remplacées par des alanines (aucune phosphorylation possible), la

cycline B demeure dans le cytoplasme¹²⁷. Ces observations suggèrent que la phosphorylation de la cycline B durant la mitose permet son accumulation dans le noyau.

Tout comme la cycline B1, la phosphatase Cdc25 est située dans le cytoplasme pendant l'interphase et est relocalisée dans le noyau pendant la prophase. Ceci est un autre moyen pour la cellule d'influencer l'entrée en mitose. À l'instar de la cycline B, Cdc25 possède un NLS et deux NES¹³². La phosphorylation sur le résidu Ser216 lui permet d'interagir avec la protéine 14-3-3 et d'être séquestré dans le cytoplasme. Une mutation de ce site empêche la liaison avec 14-3-3 et accélère le taux d'importation de Cdc25¹³³. En ce qui concerne la kinase WEE1, elle se retrouve dans le noyau durant la totalité du cycle cellulaire, même si une fraction majeure est exportée dans le cytoplasme durant la prophase. Le mécanisme à l'origine de cette exportation n'est pas encore connu⁸⁴.

1.2.3.4. Rôle de commutateur pour la CDK

Il est souvent mentionné que l'activité d'une CDK est régulée par un enchaînement de réactions impliquées dans le cycle cellulaire. Néanmoins, il a été démontré que le complexe Cdk1/Cycline B oscille de façon indépendante et il continue d'osciller même quand la réplication de l'ADN et la mitose sont bloqués⁶⁸. Pour expliquer ceci, l'idée des réactions irréversibles a été introduite dans la régulation du cycle cellulaire. Par exemple, à la fin de la mitose, Cdc2 active le complexe APC/C, qui mène à la dégradation de la cycline B et à son inactivation. Dans un autre exemple, pour entrer dans la phase M, il y a une boucle de rétroaction positive qui comprend l'activation de la Cdk1 par Cdc25 et l'activation de la Cdc25 par la Cdk1 active (Figure 4)¹³⁴. Parce que cette boucle de rétroaction positive assure que l'activation complète de la CDK, cette étape agit comme un commutateur pour l'activation du complexe Cdk1/cycline B¹³⁵.

1.2.4. Interactions avec l'horloge circadienne

Chez les mammifères, l'horloge circadienne est organisée de façon hiérarchique, avec une horloge centrale située dans le noyau suprachiasmatique (SNC) de l'hypothalamus

et des horloges périphériques dans pratiquement toutes les autres cellules du corps. L'horloge centrale produit des signaux périodiques qui sont reçus par des oscillateurs périphériques afin de synchroniser toutes les horloges de l'organisme. Les horloges périphériques contrôlent à leur tour l'expression des gènes et l'expression enzymatique pour les rythmes physiologiques et le métabolisme dans les différents tissus¹³⁶.

Le mécanisme de l'horloge circadienne est basé sur un réseau de boucles de rétroaction positives et négatives. Les principaux composants positifs de ces boucles sont les facteurs de transcription CLOCK et BMAL1. Ils forment un complexe qui cible les éléments E-box dans les promoteurs des gènes. Parmi ces gènes, il y a les gènes *Per* (PERIOD) et *Cry* (CRYPTOCHROME), qui sont les principaux composants négatifs de la même boucle de rétroaction. En plus des modifications post-traductionnelles, les facteurs de transcription sont des éléments de contrôle supplémentaires permettant de réguler les oscillations de l'horloge¹³⁷.

La division cellulaire de certains organismes¹³⁸ ou des cellules des tissus d'un organisme¹³⁹⁻¹⁴⁴ peut être associée à des temps spécifiques de la journée. Un ou plusieurs points d'interaction doivent alors exister entre le cycle cellulaire des cellules et le rythme circadien des organismes pour que cette synchronisation ait lieu. Plusieurs études récentes ont identifié différentes protéines régulatrices qui pourraient faire le pont entre les deux systèmes : WEE1, Chk1 et PER1.

1.2.4.1. WEE1

L'entrée en phase M du cycle de division cellulaire peut être influencée par l'effet de la kinase WEE1 sur l'activité du complexe CDK/cycline. Le gène *wee1* est directement régulé par l'horloge circadienne¹⁴⁵, parce que son promoteur contient une E-box. La transcription de *wee1* est donc activée par le complexe CLOCK-BMAL1 (Figure 6)¹⁴⁵ et son activité est inhibée par le complexe PER/CRY. Chez des souris mutantes déficientes en *CRY*, il y a perte de l'activité kinase pour Cdk1, puisque la transcription de WEE1 n'est

inactivée par aucun autre mécanisme¹⁴⁵. À l'inverse, le facteur de transcription CLOCK/BMAL1 peut initier la transcription à partir du promoteur de WEE1, indiquant que l'influence de l'horloge sur le cycle cellulaire passe par la transcription de Wee1 chez les mammifères.

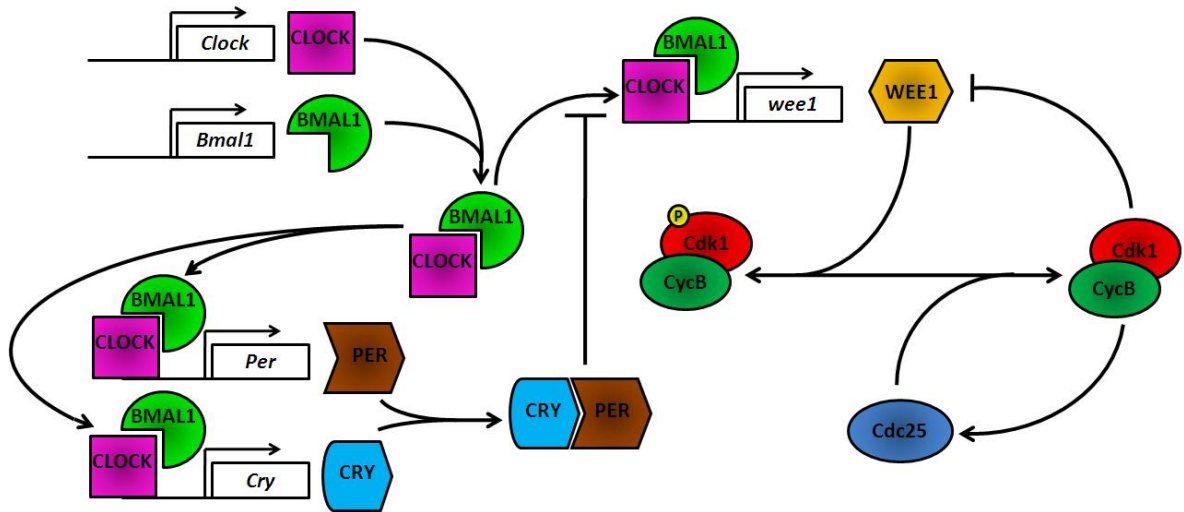


Figure 6. Régulation de WEE1 par l'horloge.

La régulation de l'horloge peut s'expliquer par une régulation au niveau de la mitose. Les boucles de rétroaction qui activent ou désactivent le complexe Cdk1/CycB permettent un changement rapide de l'activité de Cdk1. Des signaux de l'horloge (par exemple le cycle luminosité/ noirceur) permettent la régulation de l'horloge circadienne par la transcription des gènes *Clock* et *Bmal1*. L'hétérodimère CLOCK/BMAL1 se lie à la séquence E-box qui se retrouve dans la séquence promotrice des gènes de l'horloge *Period* (*Per*) et *Cryptochrome* (*Cry*), ce qui permet leur transcription. Ces deux protéines vont à leur tour former un dimère afin d'inhiber le complexe CLOCK/BMAL1, ce qui inhibera leur propre transcription ainsi que celle des gènes *Clock* et *Bmal1*. La séquence consensus E-box se retrouve aussi dans le promoteur de *wee1*, ce qui permet au dimère CLOCK/BMAL1 d'inhiber la mitose via la transcription de *wee1*.

Cette transcription est aussi inhibée par le dimère PER/CRY, ce qui permet à l'horloge de promouvoir la mitose. *Figure inspirée de Cardone & Sassone-Corsi¹⁴⁶ (2003) et de Perry & Kornbluth (2007)⁸²*

1.2.4.2. Chk1/Chk2

Il a aussi été démontré que le kinase checkpoint Chk2 chez *Neurospora*, PRD-4, joue un rôle dans le rythme circadien ainsi que le cycle cellulaire¹⁴⁷. Lorsque l'ADN est endommagé, PRD-4 phosphoryle Cdc25 afin que celui-ci soit inactivé, empêchant ainsi le cycle cellulaire de se poursuivre. Néanmoins, PRD-4 possède au moins une autre protéine cible, une protéine de l'horloge circadienne chez *Neurospora*, FRQ. En effet, Pregueiro & al. (2006)¹⁴⁸ ont été capables d'immunoprécipiter le complexe formé par PRD-4 et FRQ. De plus, à l'aide de données de densitométrie, il a été démontré qu'il y a un décalage de l'horloge circadienne lorsqu'il y a un dommage à l'ADN en présence de PRD-4, ce qui n'est pas le cas chez le type mutant $\Delta prd-4$. Les niveaux d'ARNm de *PRD-4* et de *FRQ* sont aussi coordonnés, ce qui suggère qu'ils agissent de concert.

1.2.4.3. PER1

La protéine PER1 semble interagir avec des éléments régulateurs du cycle cellulaire. Ces effets ont été démontrés dans les cellules sur-exprimant *Per1* et exposées aux radiations pour provoquer des dommages à l'ADN. Normalement, quand l'ADN est endommagé, les cellules arrêtent la progression cellulaire pour permettre des réparations; alternativement, si le dommage est trop sévère, elles induisent l'apoptose. Ces deux effets sont médiés principalement par p53, qui est une des cibles les plus importantes des kinases checkpoint. Chez des cellules qui sur-expriment *Per1*, la radiation ne provoque pas l'arrêt en G2/M, mais à la place, les cellules entrent davantage en apoptose. L'effet pourrait

s'expliquer par des interactions directes entre PER1 et les kinases checkpoint, tels que démontré par des co-immunoprécipitations¹⁴⁹.

1.3. Étude du cycle cellulaire chez les dinoflagellés

Bien qu'ils apportent une importante contribution à la fixation de carbone et qu'ils jouent un rôle important au niveau de la préservation de certains écosystèmes, les dinoflagellés restent un phylum relativement peu étudié. En effet, ce n'est qu'en 2004 que le tout premier gène régulateur du cycle cellulaire d'un dinoflagellé a été cloné et séquencé. Cette découverte permet de supporter l'idée que la régulation du cycle cellulaire se fait à l'aide de complexes CDK/cycline comme d'autres organismes. Auparavant, les caractéristiques uniques des dinoflagellés (chromosomes condensés en permanence, l'enveloppe nucléaire toujours présente) permettaient de penser que la régulation de leur cycle cellulaire aurait pu être différente de celle retrouvée chez les autres organismes. En plus, la nocodazole, un produit chimique inhibant la polymérisation des microtubules, prolonge la métaphase, suggérant ainsi qu'il y ait un point de contrôle pendant la phase M¹⁵⁰. Une autre protéine de 34 kDa identifiée aurait pu être une CDK, puisque'elle interagit avec l'anticorps anti-PSTAIRE¹⁵¹⁻¹⁵⁴ (un domaine hautement conservé de la CDK impliqué dans sa liaison avec la cycline⁵¹), mais elle ne possède pas de domaine kinase chez *Lingulodinium polyedrum*¹⁵⁵.

Le seul régulateur découvert jusqu'à maintenant est la LpCyc1, une cycline du dinoflagellé *Lingulodinium polyedrum*. Elle a été isolée par complémentation fonctionnelle chez une levure mutant *cln123*⁴⁹. L'approche par complémentation fonctionnelle a été utilisée, car des approches génétiques (classiques ou inverses) sont impossibles chez *Lingulodinium polyedrum*. Cette technique consiste à contruire une banque d'ADNc à partir des ARNm de *Lingulodinium polyedrum*. Cette banque sert ensuite à transformer des levures conditionnelles mutantes dans les *Clb1234* ou les *Cln123*. Les levures capables de

croître démontrent qu'elles ont sont capables de compenser les gènes supprimés via l'ADNc contenu dans le vecteur d'expression avec lequel elles ont été transformées.

La complémentation de la levure mutante *Clb1234* n'a pas réussie, mais les produits de deux ADNc différents ont complémenté les levures mutantes *Cln123*. Un d'eux possédait deux domaines cyclines et la boîte de dégradation (RxxLxxIxN) typiques aux cyclines mitotiques, suggérant que la protéine isolée soit une cycline de phase M plutôt qu'une cycline de phase S, ce qui était anticipé par le rôle joué par les *Cln123* chez la levure. Chez la levure bourgeonnante, une cycline peut promouvoir autant la phase S que la phase M¹²⁹,¹⁵⁶, ce qui peut expliquer que LpCyc1, bien qu'elle soit une cycline de phase M, ait été capable de récupérer le mutant *Cln123*. Le mécanisme des gènes *Clb1234* est complexe et il a déjà été démontré que *Clb1* et *Clb3* sont tous deux prérequis pour compléter un mutant *Clb2*¹⁵⁷. Il se peut alors que la séquence LpCyc1 isolée soit incapable de subvenir à la viabilité de la levure mutante *Clb1234*, bien qu'elle soit une cycline de phase M⁴⁹. En plus, un anticorps créé contre la région N-terminale réagit avec une protéine de 68 kDa et démontre une plus grande abondance de LpCyc1 dans les cellules en phase G2 que celles en phase G1, comme attendu d'une cycline mitotique⁴⁹. Par contre, la caractérisation de la LpCyc1 est malheureusement incomplète, et il n'y a aucune donnée en ce qui concerne sa localisation et son état de phosphorylation au cours du cycle cellulaire.

L'autre protéine capable de compléter la levure mutante a été identifiée comme étant une protéine de la famille AAA (LpAAA). Par contre, la LpAAA n'est pas une cycline et n'a aucune similarité avec d'autres régulateurs connus du cycle cellulaire¹⁵⁸. Généralement, les protéines de la famille ATPases AAA utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour induire des changements conformationnels chez une large gamme de substrats^{159, 160}. Comme LpAAA n'est pas capable de récupérer le quadruple mutant *Cln123-Clb5*, il a été proposé que LpAAA augmente la transcription de *Clb5*. Dans la levure mutante *Cln123* transformée avec LpAAA, l'expression de *PCL1*, une cible de SBF, est activée tout comme

Cib5, tandis que les niveaux d'*YHPI*, une cible de MBF, ne sont pas affectés. Il semble alors probable que l'expression de LpAAA augmente l'activité de SBF sans affecter celle de MBF, et le rôle probable de la LpAAA serait de changer directement la conformation de SBF ou encore de Whi5, un inhibiteur de SBF.

D'autres études sur le cycle cellulaire de *Lingulodinium polyedrum* ont rapporté la découverte de la Cdk5-like¹⁶¹, la CDK isolée dans un dinoflagellé. Son identification par microséquençage a aussi permis de démontrer la conservation du domaine PSTAIRE chez les dinoflagellés. La séquence d'acides aminés démontre une certaine homologie avec la classe Pho85/Cdk5 des CDK, et la quantité et l'état de phosphorylation ne varient pas au cours du cycle cellulaire, ce qui suggère qu'elle n'est pas impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire. Il a aussi été démontré que l'horloge circadienne contrôle indépendamment la phase S et la phase M, car une différence dans la phase circadienne de la phase S et de la phase M a été observée lorsque les cellules sont exposées à différentes photopériodes¹⁵².

1.4. Approches et objectifs

La pierre angulaire du cycle cellulaire est sans contredit les complexes CDK-Cycline. Les autres éléments sont importants, mais généralement ne servent qu'à réguler ces complexes qui vont permettre à la cellule de pouvoir entrer dans une nouvelle étape de son cycle cellulaire. Comme la cycline LpCyc1 du complexe CDK-Cycline de la phase M de *Lingulodinium polyedrum* a déjà été identifiée et partiellement caractérisée, il est important pour la compréhension du cycle cellulaire chez les dinoflagellés de terminer sa caractérisation.

Deux des moyens classiques impliqués dans la régulation de la cycline sont les contrôles de sa quantité et de sa localisation subcellulaire. Afin de mesurer l'abondance de LpCyc1, nous proposons de faire des extraits protéiques tous les deux heures pendant un cycle circadien, et de suivre son évolution à l'aide de l'anticorps LpCyc1. Afin de localiser

la LpCyc1 au cours du cycle cellulaire, nous proposons de récolter des échantillons à différents temps, d'en faire des coupes et de les exposer à l'anticorps anti-LpCyc1 couplé avec des billes d'or. Ceci nous permettra d'observer la distribution de la LpCyc1 à l'intérieur de la cellule au microscope électronique à transmission. Dans la littérature, les changements de conformation ou de localisation de la cycline sont souvent contrôlés par sa phosphorylation. Ces changements d'états de phosphorylation d'une protéine entraînent un changement dans le point isoélectrique de la protéine. Il est alors possible de déceler un décalage de la protéine sur un gel 2D SDS-Page. Il est aussi possible de déceler un changement de migration sur un gel SDS-Page unidimensionnel. Nous proposons donc de récolter différents échantillons, d'en faire des gels 1D et 2D suivis d'un Western contre l'anticorps de la LpCyc1. Tout comme pour la localisation dans la cellule, nous croyons que le changement d'état de phosphorylation de la LpCyc1 doit être régulé de façon rigoureuse afin de ne pas induire la mitose de façon prématurée.

Dans un deuxième volet, nous proposons d'identifier et d'isoler la CDK impliquée dans l'induction de la mitose par un criblage du transcriptome complet de *Lingulodinium polyedrum*. Nous croyons qu'avec cet outil, il sera possible d'identifier la CDK du complexe initiateur de la phase M, tout comme une foule d'autres candidats dans tous les projets se rapportant à *Lingulodinium polyedrum*. Une fois que la CDK sera isolée à partir d'une banque d'ADNc, il faudra la caractériser de la même manière que LpCyc1, c'est-à-dire analyser sa séquence et dresser un profil de son expression protéique, de sa localisation et de son patron de phosphorylation.

2. Matériel et méthodes

2.1. Entretien des cultures

Lingulodinium polyedrum (CCMP numéro d'accension 1936) a été acquis du Centre de Culture pour le Phytoplancton Marin Provasoli-Guillard (Boothbay Harbor, ME). Les cultures sont maintenues dans un milieu d'eau de mer modifié (f/2) (Guillard and Ryther 1962) à une température contrôlée de $18 \pm 1^\circ\text{C}$ sous un cycle 12h lumière/12h noirceur. Le début de la phase lumineuse (lumière blanche fluorescente à une intensité de $100 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) dans le cycle lumière/noirceur est défini comme le temps 0 (LD 0) et le début de la phase obscure est défini comme étant LD 12. Les cultures ont été conservées dans la phase de croissance exponentielle jusqu'à atteindre une densité de 12-14000 cellules/mL, telle que mesurée avec un hémocytomètre.

2.2. Synthèse de l'anticorps

Pour la production d'anticorps anti-LpCyc1, le gène Cyc1 codant la cycline de dinoflagellé⁴⁹ a été d'abord cloné dans le vecteur His-tag pQE-31 (QIAGEN, Mississauga, Ontario). Le plasmide a été introduit dans *E. coli* M15 (QIAGEN) par électroporation. Une colonie bactérienne a été isolée et utilisée pour la purification de la protéine selon le protocole de QIAGEN. Brièvement, les protéines ont été extraites avec une presse de French (Thermo Scientific, Nepean, Ontario) à 17 600 psi et purifiées avec une colonne Ni-NTA agarose (QIAGEN). Les différents extraits ont été visionnés par SDS-PAGE (gel 12% acrylamide) et la bande avec la construction Cyc1-His a été découpée et extraite du gel par électroélution avec un Bio-Rad Model 422 Electro-Eluter (Bio-Rad, Mississauga, Ontario) selon le protocole fourni. Après l'extraction, la protéine a été de nouveau soumise à une SDS-PAGE, colorée au nitrate d'argent, et envoyée pour être séquencée par spectroscopie de masse (IRIC, Université de Montréal). Les protéines purifiées ont ensuite été envoyées à Genscript pour la production d'anticorps polyclonaux de lapin (Genscript, Piscataway, NJ).

2.3. Spécificité de l'anticorps

La spécificité des anticorps polyclonaux a été testée avec des extraits de protéines de *Lingulodinium polyedrum*. Les cellules récoltées à LD 22.5 ont été filtrées sur filtre de nylon 38 µm afin d'enrichir pour les cellules en G2 (Sefar Inc., Chicoutimi QC). Elles ont été resuspendues dans un tampon SDS (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1% bleu de bromophénol, 10% glycérol, 100 mM β-mercaptoéthanol) et chauffées à 98°C pendant 10 min. Les extraits protéiques ont été migrés sur un SDS-PAGE (gel 12% acrylamide) pendant une heure sous un courant de 150 V.

Les gels ont été transférés sur une membrane de nitrocellulose pendant 1 h avec un courant de 70 V. Les membranes ont été bloquées O/N à 4°C avec du TBST (137 mM NaCl, 74.4 mM KCl, 24.7 mM Tris, 0.1% Tween 20) contenant 5% de lait en poudre. Les membranes ont été incubées dans du TBST lait 5% avec une dilution de 1/6000 de l'anticorps primaire anti-cycline. Les membranes ont par la suite été lavées 4 fois avec du TBST et incubées dans du TBST lait 5% avec une dilution de 1/60 000 de l'anticorps secondaire GAR-HRP (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). La révélation de la cycline a été faite avec les substrats chemiluminescents de HRP de Millipore (Laval, QC) exposés à plusieurs intervalles de temps avec le Image Quant LAS 4000 de GE Healthcare (Baie d'Urfe, Quebec). Une coloration des membranes à l'encre de Chine sert de contrôle et permet de confirmer la reproductibilité entre les différents temps de récolte des échantillons.

2.4. Patron de phosphorylation

Pour les extraits protéiques, des cultures de *L. polyedrum* (LD 20 & 23) ont d'abord été filtrées sur de filtres de nylon 38 µm de Sefar Inc., congelées dans l'azote liquide, et entreposées à -80°C. Elles ont ensuite été resuspendues dans une solution de Trizol (Sigma-Aldrich) et ont été brisées par un traitement de 60 secondes au « bead beater » avec des billes de zirconium. Les échantillons ont été incubés 10 minutes à la température de la

pièce et les débris cellulaires ont été éliminés par une centrifugation à 12 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Ensuite, 200 µl de chloroforme a été ajouté, et les échantillons incubés 3 minutes à température pièce avant une étape de centrifugation 15 minutes à 12 000 g à 4°C. La phase supérieure qui contenait les ARN a été enlevée, et 300 µl d'éthanol 100% a été ajouté au reste. L'échantillon a été incubé 3 minutes à température pièce afin de resolubiliser les protéines avant une centrifugation de 5 minutes à 2000 g pour précipiter l'ADN. Par la suite, 1.5 ml d'isopropanol a été ajouté, l'échantillon incubé 20 minutes à la température de la pièce et centrifugé 10 minutes à 12 000 g à 4°C afin de précipiter les protéines. L'isopropanol a été éliminé en lavant le culot 2 fois pendant 20 minutes à la température de la pièce avec de l'éthanol 95%.

Les protéines précipitées ont été resolubilisées toute la nuit dans un tampon pour gel 2D (7 M Urée, 2 M Thiourée, 4% CHAPS et 0.1% de bleu de bromophénol) et la concentration de protéine a été dosée par la méthode Bradford (Bio-Rad). Ensuite, le DTT a été ajouté jusqu'à une concentration finale de 20 mM ainsi que les Bio-Lyte ampholytes (pH 3-10) jusqu'à une concentration de 0.2%. Les IPG Strip 7 cm de pH 4-7 (Bio-Rad) ont été réhydratées avec les protéines pendant 12 h à 20°C. La première dimension s'est faite avec le Protean IEF Cell (Bio-Rad) avec 250 V pendant 15 min., 4000 V pendant 2 h et finalement 4000 V jusqu'à ce que la IPG Strip ait accumulé 20 000 V. Les Strips ont été lavées 10 minutes dans le tampon d'équilibration 1 (6 M Urée, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 2% SDS, 20% glycérol et 2% DTT) et 10 minutes dans le tampon d'équilibration 2 (6 M Urée, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 2% SDS, 20% glycérol et 2.5% iodoacétamide). Les IPG Strips ont été déposées sur un gel d'acrylamide 12% et scellées avec du 1% agarose dans un tampon du gel SDS 1X. La migration a eu lieu pendant une heure à 150 V. Pour le transfert Western et la révélation de l'anticorps, il s'agit du même protocole que pour les gels 1D. La migration des protéines a été vérifiée via un contrôle interne avec PCP (protéine-a périodine-chlorophylle), une protéine déjà caractérisée. Les gels 2D ont été colorés à l'encre de Chine et alignés selon les patrons de PCP.

2.5. Microscopie électronique à transmission

Pour préparer les échantillons pour la localisation de LpCyc1, des cultures de *L. polyedrum* (LD 20, 21, 22.5, 23 & 23.5) ont été filtrées sous vide sur de filtres de nylon 38 μm de Sefar Inc. Les cellules ont été fixées pendant une heure à la température de la pièce avec une solution de 0.4 M PBS pH 7.4 contenant 3% glutaraldéhyde (qualité EM), et puis rincée deux fois avec du 0.4 M PBS pH 7.4. La déshydratation des cellules s'est faite avec deux lavages d'éthanol 70% de 30 minutes chaque à température pièce. Par la suite, les cellules ont été enrobées avec une résine de L.R. White (Sigma-Aldrich) selon le protocole du manufacturier. Le bloc polymérisé a été coupé en fine sections qui ont été montées sur des grilles de nickel couvertes de formvar-carbone et séchée tout la nuit. Avant la réaction avec l'anticorps, les sections ont été réhydratées avec des lavages consécutifs de 30 secondes dans de l'éthanol 90%, 70%, 50%, 25% et suivi d'un lavage de 5 minutes dans l' H_2O double distillée et filtrée. Les coupes ont été bloquées pour une heure dans du TBST 3% BSA filtrés et incubées avec l'anticorps anti-cycline dilué 1/600 dans du TBST 3% BSA toute la nuit à 4°C. Ensuite, les sections ont été trempées 30 fois à trois reprises dans du TBST filtré et incubées une heure avec des anticorps secondaires liés avec de l'or colloïdal 10 nm (Ted Pella, Redding CA) dilués 1/100 dans du TBST. Les cellules sont encore trempées 30 fois à trois reprises dans le TBST et colorées avec de l'uranyl citrate pendant 30 minutes afin d'augmenter le contraste des coupes. Les sections ont été lavées 3 fois avec de l'éthanol 50% avant d'être observées au microscope électronique à transmission.

2.6. Cytométrie en Flux

Pour la cytométrie en flux, des extraits de 200 μl de culture de *L. polyedrum* prélevés à des temps différents (LD 20, 21, 22.5, 23 & 23.5) ont été centrifugés 5 minutes à 1000 g. Les cellules ont été lavées avec 100 ml d'éthanol 70% et centrifugées de nouveau. Les cellules ont par la suite été incubées à la lumière pendant une heure, avec de l'éthanol

70% et 100%. Les cellules ensuite été resuspendues dans 1 ml d'eau avec 50 µl de Ribonucléase A à 1 mg/µl (Sigma-Aldrich) pour une incubation de 30 minutes à 30°C. Pour colorer de l'ADN, l'Iodide de propidium dans un ratio 1:20 de volume de cellules a été ajouté et les échantillons ont été incubés 15 minutes dans le noir à la température de la pièce. Les cellules ont par la suite été analysées par FACScan (BD Biosciences, Mississauga, ON) à raison de 10 000 événements par lecture. Ces mesures ont permis de déterminer l'efficacité de l'enrichissement des cellules G2/M dans les cultures filtrées.

2.7. Séquençage

Pour la création du transcriptome, 5 échantillons différents de *L. polyedrum* ont été analysés : LD 6, LD 18, kystes, sans nitrates, et LL 18 (la phase de noirceur a été remplacée par une exposition à lumière constante). Les kystes ont été préparés d'une culture de *L. polyedrum* qui a été incubée à 4°C pendant 72 h. L'échantillon sans nitrate représente des cultures isolées par centrifugation et resuspendues dans un milieu f/2 préparé sans nitrate (NaNO₃). Elles ont été récoltées à LD 6, 60 heures après l'ajout du nouveau milieu. Tous ces échantillons ont été filtrés sous vide sur des filtres de nylon 25 µm de Sefar Inc. et conservés à -80°C. Les cellules ont été brisées dans l'azote liquide avec un mortier et un pilon et l'extraction des ARN totaux a été effectuée avec du Trizol (Sigma-Aldrich) selon le protocole fourni par le manufacturier.

La qualité des ARN totaux a été analysée par Northern sur des gels de formamide/formaldéhyde ¹⁶². La sonde d'ADN provient de la digestion d'un clone du gène PCP par l'enzyme NcoI (NEB, Pickering, Ontario) purifié sur gel selon le protocole de miniElute de QIAgen (QIAgen). Le mélange réactionnel se compose de 30ng (1ng/µl) de PCP (digéré, purifié et dénaturé), 0.5µl Klenow (Promega, Nepean Ontario), 2µl dTCG (0.5mM), 2 µl BSA (10mg/ml), 5 µl tampon d'élongation 1X (Promega), 5µl [α -32P] ATP (3000 Ci/mol) (Perkin Elmer, Vaudreuil-Dorion, QC). Après une incubation à la température de la pièce pendant une heure, les ADN synthétisés radioactifs sont résolus du

reste de la réaction sur une colonne avec une résine de Bio-gel P-60 (BIO-RAD), puis chauffés à 95°C pendant 10 minutes. L'hybridation s'est faite à 65°C toute la nuit. La membrane de Nylon+ a été exposée 3 heures et révélées par Typhoon phospho-imager (Amersham Biosciences, Oakville, Ontario).

La purification des ARNm a été effectuée selon le protocole Poly(A) Purist (Ambion, Streetsville, Ontario). La quantité totale des ARN a varié entre 800 et 2000 ng. La qualité des ARNm a été analysée par Northern comme pour les ARN totaux. Les échantillons d'ARNm ont par la suite été envoyés au centre génomique de McGill pour le séquençage Illumina.

Une autre tentative pour la création du transcriptome a utilisé une ARN préparé de la même façon, mais pour cet échantillon, un ADNc normalisé a été synthétisé commercialement (Clontech). Deux séquençages 454 ont été effectués et les séquences ont été assemblées par la compagnie Agencourt.

3. Résultats

3.1. LpCyc1

3.1.1. Spécificité de l'anticorps

La caractérisation de la LpCyc1 comporte trois volets dont deux sont présentés dans ce mémoire: le turnover protéique et l'état de phosphorylation. Le pré requis commun à ces expériences est l'anticorps anti-LpCyc1. Comme l'anticorps précédent⁴⁹ est désuet puisqu'il ne lie plus spécifiquement son antigène dans un extrait protéique de *Lingulodinium polyedrum*, un nouvel anticorps anti-LpCyc1 a été produit. Cet anticorps est issu du même clone que l'ancien anticorps de LpCyc1. La spécificité du nouvel anticorps avec la cycline LpCyc1 a été testée avec succès sur un échantillon protéique de *Lingulodinium polyedrum* (Figure 7A). L'anticorps détecte une seule bande de 68 kDa, comme il a déjà été démontré auparavant⁴⁹.

3.1.2. Patron d'expression protéique

Il a été possible d'établir un patron d'expression de la LpCyc1 en récoltant des échantillons sur une période de 22 heures à partir de LD4 (Figure 7B), soit juste après la vague de mitoses observée quotidiennement, jusqu'à LD2, où les niveaux de la LpCyc1 ne sont plus détectables. Un Western blot effectué à partir de ces échantillons avec l'anticorps anti-LpCyc1 nous permet d'observer un patron d'expression de la protéine dans le temps. Les échantillons proviennent de la même culture et contiennent chacun l'équivalent de 200 mL. La cycline n'est pas détectable à LD4, ni à LD12, et ce n'est qu'à LD20 qu'un faible signal est détecté par chemiluminescence. On observe un taux d'expression maximal de LpCyc1 dans l'intervalle LD21 à LD23. À LD0 et LD1, l'intensité du signal est moindre et ce n'est qu'à LD2 que la cycline n'est plus détectable. Afin de démontrer que les différentes extractions possédaient les mêmes quantités de protéines, la membrane a été colorée avec de l'encre de chine et une bande a été isolée pour démontrer que son intensité reste la même dans chacun des puits.

3.1.3. Phosphorylation

Lorsqu'une protéine est phosphorylée, le groupe hydroxyle neutre d'un acide aminé est remplacé par un phosphate (PO_4^{3-}), ce qui ajoute une charge négative sur la protéine. Afin de détecter ce changement de charge sur la cycline, deux Westerns d'extraits de protéines de *Lingulodinium polyedrum* (LD20 et LD23), transférés à partir de gels 2D, ont été hybridés contre l'anticorps anti-LpCyc1 afin de déterminer le changement dans le point isoélectrique de LpCyc1. Comme LD20 est avant le pic d'expression, il devrait présenter deux états de phosphorylation de LpCyc1, l'un indiquant que LpCyc1 se situe dans le cytoplasme, et l'autre indiquant que LpCyc1 a été importé dans le noyau. Comme LD23 est après le pic d'expression à LD21, la totalité des LpCyc1 devrait se trouver dans le noyau avec le même état de phosphorylation.

Comme anticipé, l'anticorps reconnaît la LpCyc1 à un seul endroit à LD23 (Figure 7D), ce qui démontre qu'il existe un seul état de phosphorylation à ce temps. Par contre, à LD20 (Figure 7C), l'anticorps reconnaît la LpCyc1 à deux endroits, ce qui indique qu'une partie des protéines est phosphorylée et que l'autre ne l'est pas. Une de ces deux détections est située au même endroit que celui de la LpCyc1 à LD23, tandis que l'autre est située à un pH plus acide et à un poids moléculaire plus élevé. Pris ensemble, ces résultats nous démontrent que la LpCyc1 possède deux différents stades de phosphorylation qui pourraient affecter sa régulation dans le cycle cellulaire de *Lingulodinium polyedrum*.

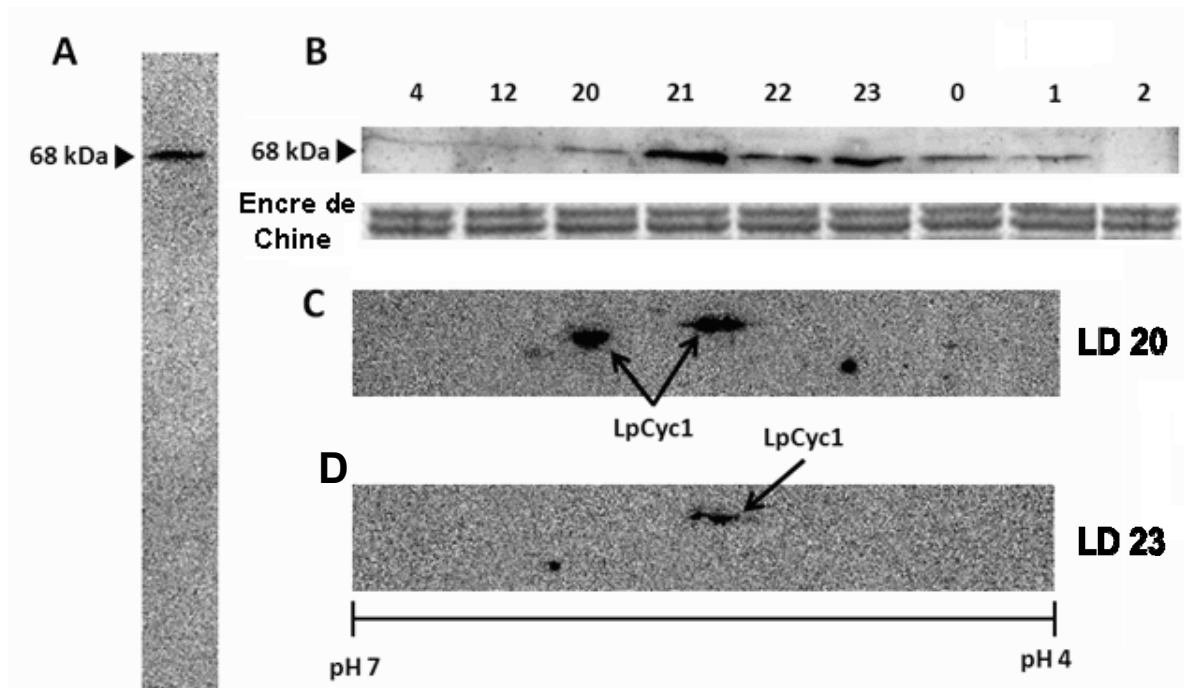


Figure 7. Caractérisation de LpCyc1 par transfert Western.

Toutes ces expériences sont des Western blots de gels SDS-PAGE 10% transférés sur des membranes de nitrocellulose. La figure A permet de démontrer la spécificité de l'anticorps anti-LpCyc1. Par la suite, afin d'observer l'expression de la cycline dans le temps, des extraits protéiques ont été effectués sur 22 heures. Une hybridation avec l'anticorps anti-LpCyc1 permet de visualiser l'oscillation de la cycline dans le temps (B). La membrane a été colorée avec de l'encre de Chine comme contrôle de chargement (B). Puis deux extraits ont été soumis à une migration sur gel 2D. Un extrait a été prélevé à LD20 (C) et un deuxième à LD23 (D), permettant ainsi de démontrer qu'il y a un changement dans le point isoélectrique de la LpCyc1 dépendamment de l'étape du cycle cellulaire.

3.2. Séquençage du transcriptome

Nous avons effectué deux approches pour établir le transcriptome de *L. polyedrum*. Dans un, une banque d'ADNc normalisé a été séquencé avec la méthode 454. Dans la deuxième, la technologie Illumina a été utilisée pour la séquençage de l'ARNm. Le transcriptome établit avec ces expériences permet d'identifier une grande quantité de gènes, ce qui facilitera beaucoup les études moléculaires de *L. polyedrum*.

3.2.1. Séquençage 454

Un échantillon de cellules de *L. polyedrum* a été prélevé et ses ARN totaux ont été extraits avec la méthode au Trizol. A partir de cet échantillon, la synthèse d'ADNc a été effectuée commercialement avec la technologie SMART (Clontech). Par la suite, les ADNc ont été normalisés commercialement avec la technologie DSN (Double Strand Nuclease) (ClonTech). Après la normalisation, nous avons un total de 3 µg d'ADNc qui ne donnait pas de signal avec les sondes PCP ou LBP dont les ARNm sont très abondants dans la cellule. Cet échantillon a été séquencé avec la technologie 454 et assemblé commercialement (Agencourt). Un résumé global de ce séquençage est retrouvé dans le tableau 2.

Afin de vérifier la qualité du séquençage, nous avons effectué une analyse comparant les séquences obtenues avec les EST déjà existants pour *L. polyedrum*. Le logiciel Nucmer¹⁶³ a été utilisé pour comparer la base de données des ESTs avec les séquences obtenues. Les résultats, rapportés sous forme d'un graphique montrent le pourcentage d'identité d'un EST avec une séquence du transcriptome en fonction de la couverture de l'EST pour chaque EST (Figure 8B), démontrent clairement que les séquences obtenues des ADNc ne s'accordent pas bien avec la banque publique d'EST. C'est à partir de ces résultats que nous avons décidé d'essayer une méthode différente afin d'établir le transcriptome.

Tableau II. Statistiques du pyroséquençage 454 et du séquençage Illumina

	454	Illumina
Reads	Nombre	2.9 M
	Longueur moyenne (nucléotides)	310
	Nombre de bases	912 M
Contigs	Nombre	204 687
	Nombre de bases	85.9 M
	Longueur moyenne	419
	Écart type	190
	Longueur médiane (nucléotides)	470
	> 300 nucléotides	72 935
	Longueur minimum	40
	Longueur maximum	2210
	%GC	46.5
		66.2

3.2.2. Séquençage Illumina

Un total de 5 échantillons a été séquençé pour le séquençage avec la technologie Illumina : LD6, LD18, kystes, sans nitrates, et 18 heures sous lumière constante (LL18). Les ARN totaux ont été extraits au Trizol et les ARNm ont été isolés avec des billes magnétiques. Par la suite, ces ARNm ont été fragmentés par hydrolyse alcaline pour générer des fragments d'environ 300 pb qui sont utilisés pour la synthèse d'ADNc par amorces aléatoires (random priming). La préparation de l'échantillon et le séquençage avec la technologie Illumina ont été faites au Centre d'innovation de Génome Québec. Les données des différents échantillons ont été regroupées afin de procéder à un assemblage complet du transcriptome de *L. polyedrum*. Les résultats de cet assemblage sont retrouvés dans le tableau 2.

Une comparaison entre des séquences Illumina et les EST avec Nucmer démontrait que 92% des EST étaient présent dans notre transcriptome avec un pourcentage d'identité moyen de 98% (Figure 8A). Une recherche d'identité à été effectuée dans la banque de données NR avec le programme BLASTn pour le 8% des séquences restantes, mais aucun résultat pertinent n'est ressorti de cette analyse.

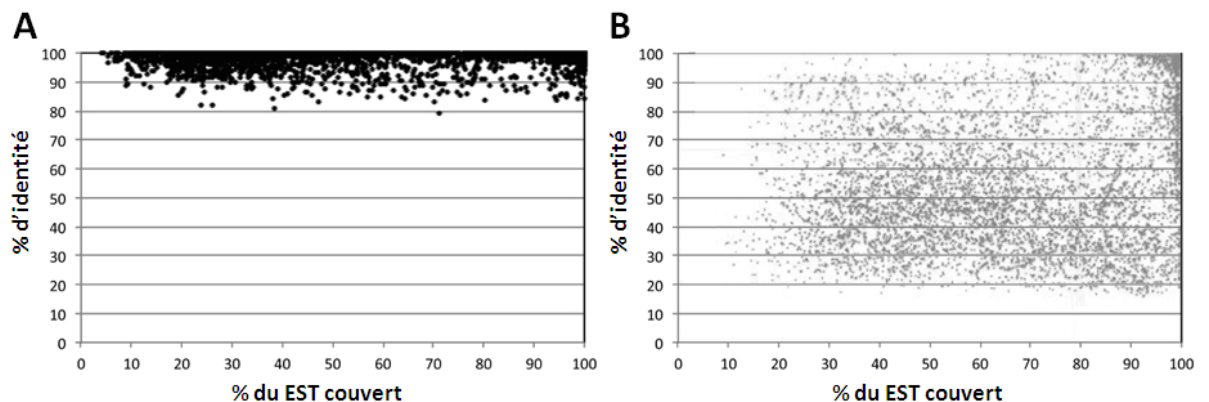


Figure 8. Couverture des EST de *Lingulodinium polyedrum* par les séquençages Illumina et 454.

L'axe vertical est un gradient de pourcentage d'identité entre les ESTs et les séquences du transcriptome. L'axe horizontal représente un gradient du pourcentage de la longueur de l'EST couvert par les séquences qui le couvrent. Les EST de *Lingulodinium polyedrum* ont été comparés avec le séquençage Illumina (A) et 454 (B).

3.2.3. M-CDK

Nous avons utilisé le transcriptome assemblé à partir des séquences Illumina afin d'identifier des CDK de la phase M qui pourraient être présentes chez *L. polyedrum*. Pour ce faire, les séquences du transcriptome ont été criblées avec la séquence protéique de Cdc28 (la Cdk1 de *S. cerevisiae*) en utilisant tBLASTn¹⁶⁴. Plusieurs séquences proviennent de cette comparaison, mais meilleure homologie est la contig 3321 (l'espérance

mathématique, ou $E \text{ Value} = 4.06 \times 10^{-102}$). L'alignement de la Cdk1 et du contig 3321 est disponible en annexe. La $E \text{ Value}$ est un paramètre indiquant la chance de tomber par hasard sur une séquence ayant une homologie égale ou meilleure à celle de la séquence trouvée. Plus la $E \text{ Value}$ est près de 0, plus la séquence l'homologie est significative. La séquence d'acides nucléiques de ce contig ainsi que les domaines conservés sont présentés à la Figure 9. La structure de la protéine est aussi comparée à celle de Cdc28. La LpCdk1 possède un codon d'initiation méthionine au début de sa séquence et présente des domaines spécifiques aux CDK, comme le site actif, le site de liaison à l'ATP, le site de liaison des substrats, la boucle d'activation (A-Loop) ainsi que le site d'interaction Cycline/CDK. Nous avons également cherché des séquences possédant le domaine PSTAIRE, un domaine des CDK qui est essentiel à leur liaison avec une cycline. Quatre séquences démontrent une conservation de ce domaine dans le transcriptome, dont le contig 3321. Les trois autres séquences font aussi partie de la liste des protéines homologues à Cdc28, mais avec une $E \text{ Value}$ similaire ou inférieure au contig 3321.

3.2.4. Protéines régulatrices du cycle cellulaire

Beaucoup de protéines autres que la cycline et la CDK sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. Afin d'avoir une vue globale du cycle cellulaire de *L. polyedrum*, nous avons comparé par tBLASTn¹⁶⁴ les protéines régulatrices du cycle cellulaire de *S. cerevisiae* avec le transcriptome obtenu par Illumina (Figure 9B). Pour ce faire, nous avons obtenu le schéma et les séquences en acides aminés des protéines du cycle cellulaire de *S. cerevisiae* qui est disponible sur le site du KEGG Pathway (<http://www.genome.jp/kegg/pathway/sce/sce04111.html>). Toutes les protéines possédant une séquence similaire avec une $E \text{ Value}$ plus petite que e^{-15} ont été marquées en vert. Afin de juger de la pertinence de ces résultats, les contigs avec la meilleure $E \text{ Value}$ ont été soumises à un BLASTn¹⁶⁴ contre la base de données NR afin de confirmer qu'il s'agissait de séquences provenant de protéines régulatrices du cycle cellulaire (voir Annexe). Les protéines ne correspondant pas à l'un ou à l'autre de ces critères ont été colorées en rouge.

Plusieurs complexes protéiques possédaient des sous-unités qui étaient à la fois présentes et absentes du transcriptome, ces derniers sont turquoise. Il est possible de visualiser la composition de tous les complexes dans le bas de la figure 10. Ce schéma et les observations qui en découlent nous permettent d'avoir une vue globale du cycle cellulaire de *L. polyedrum*. Des 149 protéines illustrées dans la Figure 10, 77 (51,6%) sont retrouvées dans le transcriptome, tandis que les 72 autres ne le sont pas.

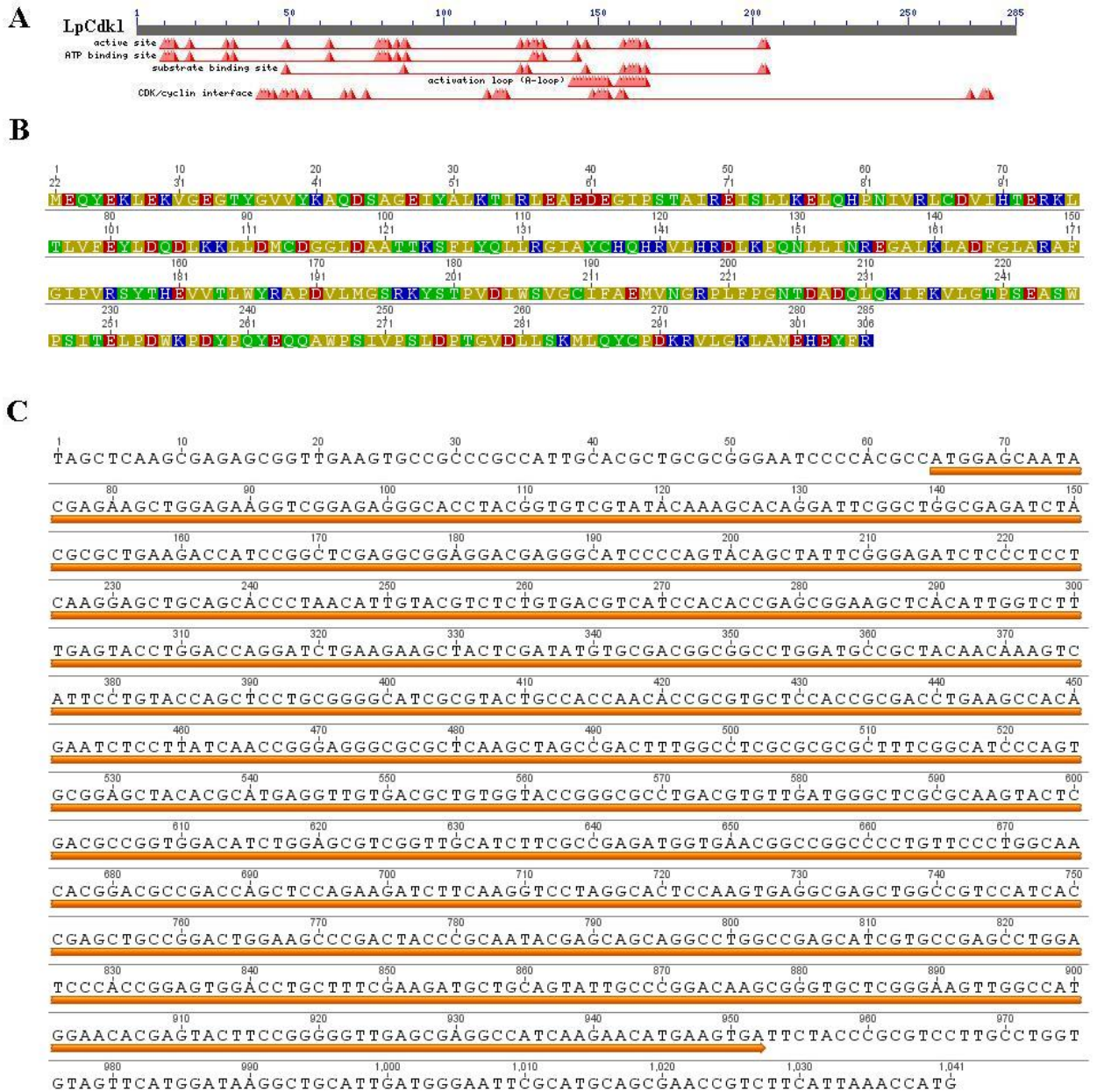


Figure 9. Séquences de la LpCdk1.

Le contig 3321 est celui qui s'apparente le plus à la Cdc28 avec une E Value de 4×10^{-102} . La séquence complète des nucléotides est présentée (C) avec le ORF qui correspond à la Cdc28 (souligné par la flèche orange). L'alignement complet du contig avec la Cdc28 est retrouvé en Annexe. La

séquence de l'ORF (B) contient plusieurs domaines conservés qui sont typiques des CDK (A) et qui sont essentiels à son activité.

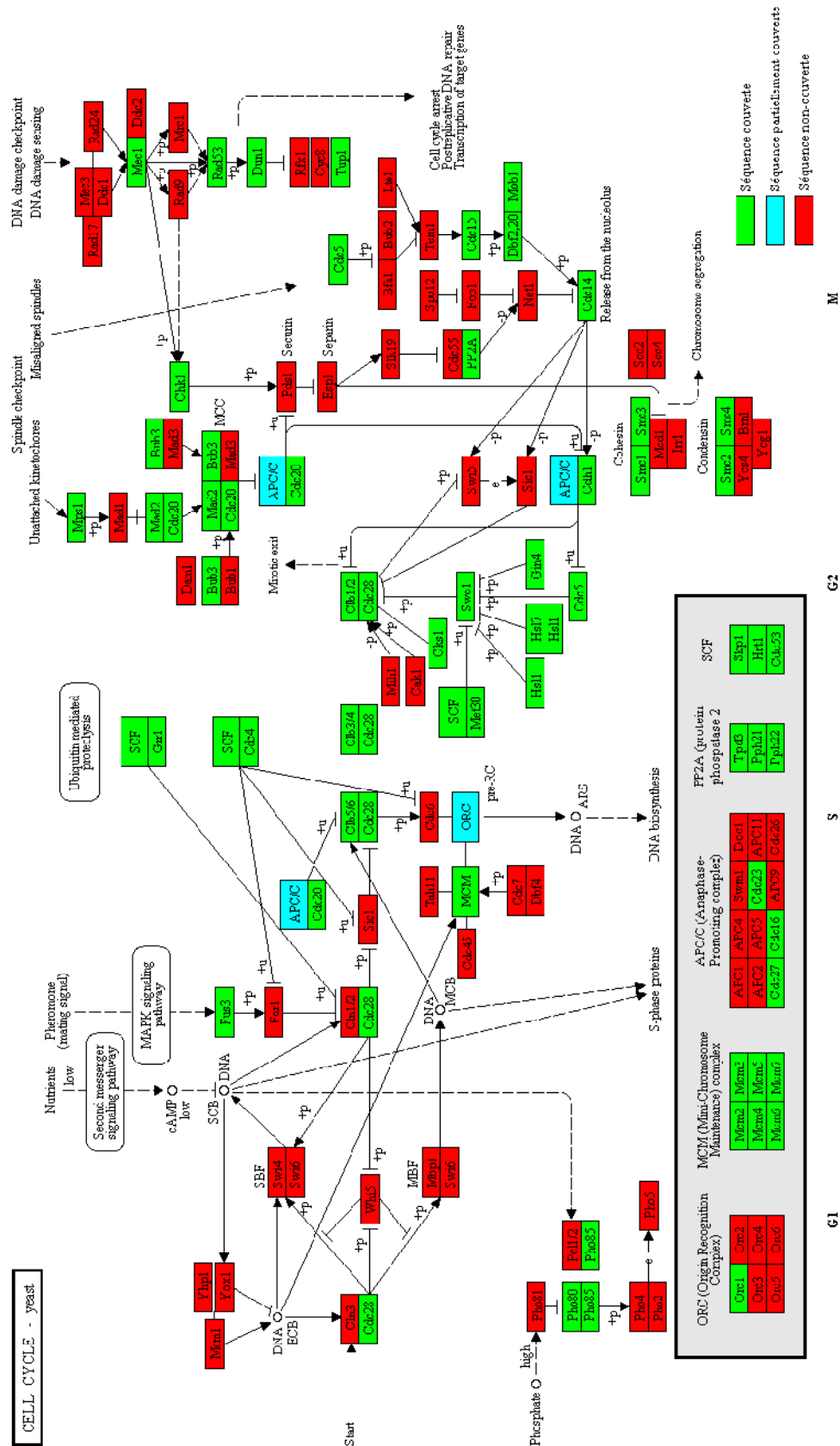


Figure 10. Couverture des protéines régulatrices du cycle cellulaire de *S. cerevisiae* par le transcriptome de *Lingulodinium polyedrum*.

Un tBLASTn¹⁶⁴ a été effectué avec les séquences protéiques de *S. cerevisiae* contre le transcriptome de *Lingulodinium polyedrum*. Les protéines possédant une similarité de séquence avec une E Value d'au moins e^{-15} sont en vert alors que les protéines n'ayant pas de contig correspondant sont en rouge. La couleur turquoise représente les complexes protéiques dont certaines sous-unités sont présentes dans le transcriptome, tandis que d'autres sont absentes. La figure a été inspirée de KEGG Pathway Cell cycle.

4. Discussion

4.1. Time-Course de la LpCyc1

Semblable à ce qui est rapporté dans la littérature pour les cyclines de la transition G2/M, LpCyc1 possède un patron d'expression cyclique (Figure 7B)⁴⁹. En effet, depuis le début de la prise des échantillons à LD 4, la LpCyc1 n'est pas détectable par son anticorps jusqu'à LD20, quand il est possible d'observer une faible bande révélée par la chemiluminescence. La révélation permet aussi de constater que la quantité de LpCyc1 est plus importante dans l'intervalle se situant entre LD 21 et LD 23, puis elle commence à diminuer jusqu'à ce qu'elle ne soit plus détectable à LD 2. En plus de confirmer le caractère cyclique de la LpCyc1, ces résultats nous permettent de confirmer la synchronisation de l'expression de la LpCyc1 avec le cycle cellulaire. En effet, la littérature rapporte qu'en général une expression explosive de la cycline responsable de la phase M a lieu tout juste avant le début de la mitose¹⁶⁵.

4.2. Phosphorylation

Comme la phosphorylation d'une protéine peut être révélée avec gel 2D^{166, 167}, nous avons utilisé cette approche afin de vérifier les différents états de phosphorylation de la LpCyc1 au cours de son cycle cellulaire. En se basant sur le time-course, nous avons décidé de récolter des échantillons à LD20 et LD23, soit au premier signe de l'apparition de la LpCyc1 et au moment où son expression est à son maximum. À LD23, la LpCyc1 n'est détectée qu'à un seul endroit sur la membrane de nitrocellulose par l'anticorps anti-LpCyc1 avec un poids moléculaire de 68 kDa, comme observé dans la littérature⁴⁹. Trois heures auparavant, soit à LD20, LpCyc1 est détectée à deux endroits différents sur la membrane de nitrocellulose. Une de ces positions se situe au même pH et au même poids moléculaire que le signal retrouvé à LD23. Par contre, le deuxième signal possède un pH plus acide et un poids moléculaire légèrement inférieur. Il a déjà été démontré que la phosphorylation d'une protéine peut affecter sa migration verticale lors de la migration dans un gel SDS-

Page ¹⁶⁸. Cette observation n'est pas visible sur la détection de la cycline avec un gel à une dimension. Ce phénomène peut s'expliquer par les différents protocoles qui sont utilisés pour extraire les protéines pour ces deux expériences. La phosphorylation de la LpCyc1 pourrait permettre de réguler son association avec la CDK de la phase M. La cycline peut être phosphorylée afin de contrôler sa localisation subcellulaire entre le cytoplasme et le noyau afin de la séparer physiquement de la CDK de la phase M afin de prévenir une entrée hâtive en mitose ¹⁶⁹. Comme cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois, il serait de mise de la répéter afin d'appuyer la reproductibilité de ces gels 2D, puisque même si l'alignement des gels indique une migration de pH, l'intensité de LpCyc1 à LD23 est moins intense qu'à LD21, ce qui est contraire au résultat sur gel à une dimension. Les résultats obtenus permettent tout de même de supporter l'hypothèse que deux états de phosphorylation de la LpCyc1 permettent de réguler l'entrée en mitose.

4.3. Localisation

La caractérisation de la localisation n'a pas donné de résultats concluants, car il n'a pas été possible de synchroniser toutes les cellules d'une culture afin de procéder aux observations au microscope électronique à transmission. Il aurait été impossible de compiler des statistiques à partir de ces cellules, car nous n'atteignons qu'un maximum de 50% de cellules en phase G2/M. Les autres cellules n'étant pas dans ces phases, il était impossible de discriminer une cellule en phase G1 (ou phase S) ne possédant pas de LpCyc1 à une autre cellule en phase G2/S n'ayant pas encore exprimé de LpCyc1. Par contre, il y a un espoir quant à la synchronisation des cellules, car il a été démontré qu'une agitation mécanique constante empêche le cycle cellulaire de produire normalement chez les dinoflagellés. Le cycle cellulaire des cellules soumises à ces conditions s'arrête en phase G1 ¹⁷⁰. En synchronisant les cellules de cette façon et en observant l'évolution de leur cycle cellulaire, il sera possible de récolter des cellules de *Lingulodinium polyedrum* synchronisées à partir desquelles il sera possible de compiler les données nécessaires afin de démontrer le moment exact où LpCyc1 est importée dans le noyau à partir du

cytoplasme. Sans la synchronisation des cellules de *Lingulodinium polyedrum*, il est impossible de différencier les différents stades du cycle cellulaire au MET (microscope électronique à transmission). Par contre, même sans la synchronisation, nous avons observées des cellules comportant des ratios de LpCyc1 beaucoup plus important à l'intérieur du noyau que dans le cytoplasme. Malgré l'absence de résultats probants, la spécificité de l'anticorps avec des coupes a pu être observée au MET (voir Annexe).

Même sans les résultats concluant de la localisation, nous pouvons affirmer que la LpCyc1 est une cycline de la phase M avec l'analyse de sa séquence ⁴⁹, ses niveaux d'expression et son patron de phosphorylation.

4.4. Transcriptome 454

Après la méthode Sanger, la technologie 454 de Roche (pyroséquençage) semblait être très prometteuse. La technologie semblait d'autant plus intéressante pour l'étude d'organismes peu connus et hors du commun comme *L. polyedrum*, où la recherche et l'identification de nouveaux gènes candidats est complexe et fastidieuse (comme par la complémentation fonctionnelle chez la levure). Le séquençage du transcriptome via le 454 visait à nous permettre d'obtenir les séquences de plusieurs gènes déjà annotés par similarité de séquence. La technologie permettait d'avoir 1 500 000 séquences brutes d'une longueur moyenne de 300 nucléotides, ce qui revenait à un prix très avantageux pour la quantité d'informations que l'on obtient par rapport à la méthode de Sanger. Le défi résidait dans l'assemblage de ces milliers de séquences sans avoir de gabarit sur lequel se fier au moment de raccorder toutes les séquences les une à la suite des autres.

Les ARN totaux ont été extraits avec la méthode au Trizol et la synthèse des ADNc s'est faite avec le kit SMART de Clontech, qui permet l'amplification spécifique des ARNm complets sous forme d'ADNc. Comme le but premier du projet était d'obtenir un transcriptome complet, l'ADNc a ensuite été normalisé, afin que les ARNm en moins grande concentration dans l'échantillon initial représentent une partie plus imposante lors

du séquençage. L'analyse de ces ADNc se fait par hybridation avec des gènes hautement représentés (PCP et LBP, qui compose environ 1% des ARNm chaque) avant et après la normalisation. Ces analyses démontrent que les ADNc avant ces manipulations étaient bien intacts et de pleine longueur. Après la normalisation, ni PCP ni LBP ne pouvaient être détectés. Clontech nous a affirmé que c'était tout à fait normal et que l'absence de détection de PCP prouvait que la normalisation était bel et bien une réussite. Il reste que la qualité des ARN après la normalisation ne peut pas être testée directement.

La compagnie Agencourt a été choisie pour le service de séquençage 454 GS FLX, car à l'époque, elle était la seule à proposer un séquençage à partir des 3 µg d'ADNc disponibles. Avec deux réactions, nous avons obtenu 912 Mégabases, provenant de 2,9 millions de reads d'une longueur moyenne de 310 bases. Ensuite, lorsque l'assemblage a été fini, nous avons obtenu 204 687 contigs d'une longueur moyenne de 419 bases (Tableau 2). Afin de vérifier ces résultats, nous avons comparé des séquences Sanger de *L. polyedrum* disponibles dans la banque des séquences exprimées (EST, expressed sequence tags) avec l'assemblage (Figure 8B). Ce graphique représente le pourcentage d'identité entre les EST et les assemblages 454 en fonction du pourcentage de la longueur de l'EST couverte par le 454. L'axe horizontal représente un gradient de la longueur de la séquence Sanger qui est couverte par la séquence la plus similaire fournie par la 454. L'axe vertical représente un gradient de similarité de séquence entre une séquence Sanger et la séquence la plus similaire fournie par le 454. Donc un point se retrouvant en haut à droite (100%, 100%) représente une EST Sanger couverte sur la totalité de sa longueur avec une parfaite identité de séquence. Un point se retrouvant en bas à droite représente une EST couverte sur toute sa longueur, mais avec seulement 20% identité de séquence. À l'opposé, un point se situant en haut à gauche (100%, 20%) représente une EST couverte sur seulement 20% de sa longueur, mais avec une parfaite identité. Puis finalement, un point en bas à gauche (20%, 20%) représente une EST couverte sur seulement 20% de sa longueur avec seulement 20% d'identité. Idéalement, tous les points auraient dû se situer dans la région où au moins 80% de la longueur de la séquence est couverte avec une similarité d'au moins

80%. Si on analyse les données d'une autre optique, on constate que l'assemblage ne contient que 23% des EST. Ces résultats suggèrent que la qualité des séquences peut être considérée suspecte. C'est pourquoi nous avons effectué un autre séquençage, mais avec une approche différente.

4.5. Transcriptome Illumina

L'échantillon du premier séquençage a été normalisé, car l'objectif de ce dernier était d'identifier le plus grand nombre de cibles potentielles chez *L. polyedrum*. Comme cette normalisation implique plusieurs étapes d'amplification par la réaction de polymérase en chaîne (PCR) qui peut introduire des erreurs, nous avons décidé d'essayer une autre procédure lors de notre deuxième tentative. Sans la normalisation, les transcrits exprimés faiblement seront moins présents lors du séquençage et il y a une plus grande probabilité que leurs séquences ne soient pas présentes ou assemblées. La solution à ce problème a été d'utiliser la technologie Illumina qui peut fournir 200 millions de séquences d'une longueur de 76 nucléotides, pour un total de 15,000 Mégabases. Cela constitue plus de 60 fois plus d'informations que pouvait fournir la technologie 454 pour le même coût et qui permettait de résoudre le problème des transcrits faiblement exprimés.

En plus, le fait que les échantillons ne sont plus normalisés permettait aussi d'obtenir des informations supplémentaires. En sélectionnant plusieurs échantillons qui seront séquencés indépendamment mais assemblés collectivement, il est alors possible de quantifier les variations intrinsèques de chacun des transcrits en fonction des conditions auxquelles les cellules de *L. polyedrum* ont été soumises. Cette technique, appelée RNA-Seq, est basée sur le fait que le nombre de séquences qui correspond à un assemblage donné est une valeur quantitative. Afin d'observer les différences entre l'expression des gènes jour et nuit, nous avons récolté des échantillons à LD 6 et LD 18, qui correspondent respectivement au milieu de la journée et au milieu de la nuit. Afin d'évaluer la variation des transcrits due à l'action de l'horloge circadienne (si changement il y a), un échantillon

a été soumis à une lumière constante et récolté à LL 18. En comparant les profils de cet échantillon avec celui récoltés à LD 18, il sera alors possible de distinguer les effets de la lumière et de l'horloge. Comme certains projets dans le laboratoire portent sur l'étude des kystes et sur le cycle de l'azote chez *L. polyedrum*, un échantillon du kyste et un échantillon avec une carence en NO_3^- ont aussi été récoltés. Une fois que les ARN totaux des échantillons ont été extraits au Trizol, les ARNm ont été purifiés et la qualité de l'ARN a été déterminée par Northern. Les ARNm de bonne qualité après purification ont été séquencés avec la technique Illumina au Centre d'Innovation de Génome Québec à l'Université McGill.

Le séquençage Illumina a produit plus d'information que le 454. Les données brutes comprennent 312 millions de séquences d'une longueur moyenne de 62,7 nucléotides pour un total de 19,626 Mégabases, soit plus de 20 fois plus d'informations qu'avec le pyroséquençage 454. Une fois assemblées ces séquences ont généré 200,045 contigs d'une longueur moyenne de 471 nucléotides. Un BLASTn¹⁶⁴ des ESTs avec l'assemblage a donné des résultats plus encourageants qu'avec les séquences du 454, car maintenant 93% des EST se trouvent dans nos séquences assemblées. En plus, le graphique produit par une analyse avec Nucmer¹⁶³ confirme que l'identité moyenne de séquences est de 98%. On a cherché l'identité des séquences non couvertes contre la base de données NR mais aucun résultat concluant n'est ressorti de ces recherches. Si on prend en compte ces résultats, nous pouvons affirmer que nous possédons une grande partie des données menant au transcriptome de *L. polyedrum*.

4.6. CDK

Deux approches différentes ont permis d'identifier les séquences provenant de l'assemblage Illumina qui pourraient correspondre à la CDK chez *L. polyedrum*. La première a consisté à effectuer un tBLASTn¹⁶⁴ des contigs de l'Illumina contre la séquence complète de la CDK de la levure *S. cerevisiae*, Cdc28. 20 séquences correspondent de

façon convaincante à la Cdc28, la dernière ayant une E Value de 2×10^{-45} et la meilleure E Value (contig 3321) se situe à 4×10^{-102} . La deuxième méthode qui a permis d'identifier 4 de ces séquences (dont #3321) consistait à rechercher la séquence PSTAIRE spécifique aux CDK. Ces séquences varient entre 738 et 1474 nucléotides, tandis que la Cdc28 possède une longueur de 897 nucléotides. Malgré cette différence, les ORF des séquences retrouvées sont très similaires à la Cdc28.

Comme l'homologie du contig 3321 se démarque des autres avec une E de 4.06×10^{-102} (la 2^e séquence avec la plus grande homologie possède une E Value de 1×10^{-88}), il y a une bonne chance que ce contig soit la CDK recherchée pour le contrôle de l'entrée en phase M. En effet, si on fait une recherche sur NCBI pour les domaines conservés de notre séquence, on s'aperçoit que tous ceux qui sont essentiels au bon fonctionnement de la CDK sont présents (Figure 9a). La contig 3321 présente tous les résidus formant le site actif, le site de liaison à l'ATP, le site de liaison des substrats, la boucle d'activation (A-Loop) ainsi que le site d'interaction Cycline/CDK. Ces domaines correspondent à la classe des CDK-like Sérine/Thréonine kinase à domaine catalytique. La séquence protéique prédite pour le contig 3321 contient donc tous les motifs requis d'une CDK de *Lingulodinium polyedrum*.

Afin d'être certain de cette séquence est complète, on pourrait cribler les différentes banques d'ADNc de *L. polyedrum* déjà existantes. Alternativement, on pourrait vérifier la longueur de la séquence en exploitant la 5' et la 3' RACE. Bien que nous ayons tous les éléments de la traduction du gène (codon START et STOP), ces expériences serviront à déterminer si les 5'UTR et 3'UTR sont complets. Il sera très intéressant d'étudier les propriétés de la CDK, car les caractéristiques nucléaires uniques chez les dinoflagellés nous laissent croire que la CDK ne devrait pas phosphoryler la même gamme de substrats que la CDK des levures. Pour faire ceci, il faudra exprimer la protéine *in vitro* et vérifier s'il y a bel et bien une interaction avec la LpCyc1 et cette CDK. Par la suite il faudra vérifier si cette liaison permet à la cellule de phosphoryler des substrats appropriés. D'autres

analyses, par exemple pour déterminer la localisation et les degrés de phosphorylation, demanderont la production d'un anticorps.

Le procédé ayant mené à l'identification de la CDK peut aussi être utilisé afin de trouver une panoplie de cibles intéressantes pour l'étude de *L. polyedrum*. Une fois que les analyses sur la CDK seront terminées, il faudra alors analyser les autres protéines impliquées dans le cycle cellulaire de *L. polyedrum*.

4.7. Protéines régulatrices du cycle cellulaire

L'association de la CDK et de la cycline permet la pleine activation de l'activité kinase de la CDK en plus de permettre une liaison spécifique aux substrats. Ce complexe clé est hautement contrôlé par un réseau de protéines. Afin de bien comprendre le cycle cellulaire de *L. polyedrum*, toutes ces protéines devront être identifiées et caractérisées. En tant que préambule à cette étude, j'ai établi une liste de toutes les protéines régulant le cycle cellulaire chez *S. cerevisiae*. Par la suite, les séquences ont servi de base de données pour un tBLASTn¹⁶⁴ avec les données assemblées du transcriptome Illumina. Un seuil minimal pour la E Value a été établi à e^{-15} afin d'établir la possibilité d'un orthologue pertinent chez *L. polyedrum*. Pour appuyer la crédibilité de ces données, toutes les séquences du transcriptome ont par la suite été soumises à un BLASTn¹⁶⁴ contre la base de données NR afin de vérifier si elles correspondaient à des protéines du cycle cellulaire similaire à une autre espèce. Après ces analyses, les protéines de *S. cerevisiae* qui présentaient un orthologue dans le transcriptome ont été marquées en vert, celles qui sont absentes ont été marquées en rouge, et les complexes comportant des sous-unités présentes et absentes ont été marqués en turquoise (Figure 10). Pour mieux comprendre ce schéma, la transition G1/S et G2/M vont être discutées séparément.

4.7.1. Transition G1/S

Le premier élément visuel qui ressort de ce schéma est que la grande majorité des protéines responsables de la transition G1/S chez *S. cerevisiae* sont absentes du transcriptome. Cet aspect n'est pas surprenant, car généralement les cyclines de la phase S ne sont pas conservées d'une espèce à l'autre ⁶². L'absence de conservation de ces cyclines de la transition G1/S pourrait aussi expliquer qu'aucune de ces cyclines n'aient été identifiées par complémentation fonctionnelle chez la levure ⁴⁹. Parmi les protéines présentes, il ne fait aucun doute que le complexe SCF ainsi que les protéines réceptrices qui lui sont associées sont présentes. Les trois protéines formant le centre du complexe sont présentes, la Ring-box protéine (Hrt1), la protéine de liaison de la famille Cullin (Cdc53) et la protéine adaptatrice (Skp1) ¹⁷¹. Les E Value des trois protéines (respectivement $1e^{-33}$, $3.6e^{-38}$ et $9.6e^{-34}$) sont moins impressionnantes que ce qui a été observé avec la Cdc28 ($4e^{-102}$), mais lorsque les contigs obtenus sont soumis à un BLASTn¹⁶⁴ contre NR, ces séquences semblent être conservés chez des espèces de dinoflagellés (*Perkinsus marinus* et *Karlodinium micrum*) (E Values $3e^{-108}$, $1e^{-82}$ et $9e^{-50}$ respectivement). La différence entre la robustesse des E Values peut être expliquée par la longueur des séquences. En effet, la séquence de Cdc28 possède 292 acide aminé, tandis que celle de Hrt1 et de Skp1 sont beaucoup plus courtes (192 et 121 a.a.). Comme la distance sur laquelle les séquences sont alignées affectent de façon substantiel la E Value, il est tout à fait normal que la valeur de la E Value des ces séquences soit moins élevée. Malgré cette baisse de la E Value pour les courtes séquences, cette donnée statistique demeure la plus significative pour trouver des séquences homologues à partir du transcriptome.

Le complexe central du SCF est normalement associé avec les protéines Cdc4 et Grr1 afin de reconnaître ses substrats appropriés dans la transition G1/S ¹⁷², et ces protéines sont aussi présentes. Ce qui est un peu plus surprenant, c'est que les substrats normalement reconnus par ces SCF^{Cdc4} et SCF^{Grr1} (Far1, Sic1, Cln1/2, Cdc6) ne semblent pas présents

dans le transcriptome. La protéine Sic1 est un inhibiteur des CDK et son rôle est de séquestrer la CDK responsable de l'entrée en phase S afin d'empêcher une duplication prématurée du matériel génétique ¹⁷³. La protéine responsable de cette fonction chez *S. pombe* est la p27, même si cette dernière ne possède aucune similarité de séquence avec Sic1 ⁹⁵. La séquence de la protéine n'est donc pas conservée au cours de l'évolution, même si sa fonction l'est, est il est donc raisonnable d'imaginer que sa séquence ne serait pas conservée chez les dinoflagellés. La protéine Far1 n'est pas requise pour la progression du cycle cellulaire, mais nécessaire à l'arrêt du cycle cellulaire et pour la différenciation en réponse à des phéromones de la conjugaison ¹⁷⁴. En laboratoire, *L. polyedrum* ne se reproduit que par mitose, même si la reproduction sexuée a été rapportée en milieu naturel. Le mécanisme de reconnaissance des cellules pour ce comportement n'a pas été étudié jusqu'à maintenant, mais il est probable que le mécanisme d'incompatibilité (s'il y en a un) chez *L. polyedrum* ne comprenne pas un homologue de Far1. Par contre, la protéine Fus3, juste en amont de Far1, est présente. C'est une MAPK impliquée dans la réponse aux phéromones chez la levure qui pourrait avoir d'autres cibles que Far1 ^{175, 176}.

De toutes les cyclines qui s'associent avec Cdc28 dans le contrôle de la phase S, seules Clb5 et Clb6 semble être présentes. Chez *S. cerevisiae*, Clb5 est responsable de la synchronisation de l'entrée en phase S ¹⁷⁷. La découverte de ces deux cyclines est cohérente avec celle du complexe APC/C^{Cdc20}, qui mène à la dégradation des complexes Cdc28-Clb5/6 ¹⁷⁸.

Les facteurs de transcriptions SBF (Swi4 et Swi6) et MBF (Mbp1 et Swi6) ainsi que leur inhibiteur Whi5 sont absents du transcriptome. SBF est l'équivalent du facteur de transcription E2F chez les mammifères et Whi5 celui de Rb, qui régulent la transcription pour la transition G1/S. Bien que ces fonctions soient conservées dans différents organismes, par exemple des mammifères, la séquence de ces protéines ne l'est pas ⁶². Il est donc possible qu'un facteur de transcription impliqué dans la transition G1/S existe aussi chez *L. polyedrum*, mais que sa séquence ne soit pas conservée. L'identification de

ces protéines va nécessiter des études biochimiques de fonction au lieu des homologies de séquence.

De toutes les protéines présentes dans le complexe de l'origine de réplication (ORC) chez la levure, seulement ORC1 a été identifié dans notre transcriptome (Figure 10). Les protéines absentes comprennent les protéines Cdc6 (qui fait partie du complexe de préinitiation), Tah11 (ou Cdt1, requise pour l'assemblage du complexe de préinitiation), Cdc7 (une kinase phosphorylant le complexe MCM et impliquée dans la régulation de la réplication de l'ADN) et Cdc45 (interagit avec le complexe MCM et l'ADN polymérase et est requise pour l'initiation et l'élongation de la réplication de l'ADN)¹⁷⁷. Avec l'organisation unique du noyau des dinoflagellés, il est possible que le mécanisme menant à la réplication du matériel génétique soit aussi différent. Par contre, seulement une seule protéine appelée Orc1/Cdc6 se trouve chez les trypanosomes¹⁷⁹. Chez *S. cerevisiae*, ces protéines interagissent directement ou indirectement avec le complexe MCM (Mini-Chromosome Maintenance) afin de réguler la réplication de l'ADN. Malgré l'absence de ces protéines régulatrices, le complexe MCM est tout de même présent chez *L. polyedrum* (Figure 10). Ce complexe est hautement conservé chez les eucaryotes et il est impliqué dans plusieurs mécanismes de la réplication de l'ADN, comme l'initiation de la transcription, l'élongation, le remodelage de la chromatine et il stabilise le génome.

Il est possible qu'un mécanisme en réponse à la disponibilité du phosphate soit présent, car le complexe CDK-cycline Pho85-Pho80 est présent. Ce complexe active normalement le facteur de transcription Pho4¹⁸⁰, mais ce dernier est absent de nos séquences. Tout comme pour les facteurs de transcription SBF et MBF, il ne semble pas y avoir de conservation de séquence pour cette protéine.

Comme le transcriptome ne couvre que 93% des EST de *Lingulodinium polyedrum*, il est plausible de penser qu'environ 10% des protéines sont absentes de notre base de données. L'absence de ces protéines n'indique donc pas nécessairement qu'elles ne sont pas présentes chez les dinoflagellés.

4.7.2. Transition G2/M

À l'instar du contrôle de la phase S, une grande quantité de protéines sont impliquées dans le contrôle de la transition G2/M. Toutes les cyclines qui s'associent à Cdc28, soit Clb1 à Clb4, y sont retrouvées. La kinase inhibitrice du complexe Cdc28-Cln1/2, Swe1 (WEE1) est aussi retrouvée dans le transcriptome et sa présence est fortement supportée pour toutes les protéines régulatrices qui lui sont associées (SCF/Met30, Hsl1, Hsl7, Gin4, Cdc5). Ce qui est plutôt inhabituel au niveau de ce mécanisme est que l'activation du complexe Cdc28-Clb1/2 se fait normalement par l'entremise de la phosphatase Mih1 (Cdc25)¹⁸¹, qui enlève les phosphates inhibiteurs ajoutés par Swe1 sur Cdc28. WEE1 et Cdc25 sont au cœur de la régulation du complexe Cdc28-Clb1/2 et cette régulation est hautement conservée au cours de l'évolution^{67, 182, 183}. Comme la protéine WEE1 est présente, une phosphatase doit normalement contrebalancer et même outrepasser l'effet de WEE1 afin que la mitose puisse avoir lieu selon les modèles existants^{184, 185}. Il est certainement possible que cette phosphatase soit présente dans les dinoflagellés, mais pas dans notre transcriptome, car nous n'avons qu'environ 93% des séquences. Alternativement, les dinoflagellés peuvent avoir une phosphatase différente possédant la même fonction que Cdc25. Il est intéressant de noter que chez les plantes, aucune protéine homologue à Cdc25 n'a été identifiée. Malgré cette absence, plusieurs indices indiquent que la CDK est quand même régulée négativement par phosphorylation^{186, 187, 188, 189}. Malgré cette absence, plusieurs indices permettent de penser que les plantes sont quand même. L'ajout du gène Cdc25 de *S. pombe* par transformation dans *Nicotiana tabacum* et *Arabidopsis sp.* permet de promouvoir la mitose, et plusieurs orthologues pouvant remplir cette fonction ont déjà été décrits¹⁹⁰⁻¹⁹². Il a aussi été démontré que la déphosphorylation de la CDK pourrait être effectuée par la protéine phosphatase 2 (PP2A)¹⁹³, qui est présente dans notre transcriptome. Une hypothèse alternative est que chez les plantes l'évolution d'un type spécial de CDK de la phase M concorde avec l'absence de la phosphatase Cdc25, ce qui aurait donné lieu à un nouveau type de CDK pouvant réguler la mitose sans la présence de Cdc25¹⁹⁴. Ces CDK ne possèdent pas le domaine de liaison à la cycline

typique (PSTAIRE), mais un motif PPTALRE^{195, 196}. De plus, l'annotation de l'algue rouge *Cyanidioshyzon merolae* révèle la présence d'une CDK de phase M (Cycline de type B), mais pas celle de la phosphatase Cdc25 (<http://merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp/>). C'est une autre constatation qui permet d'appuyer un modèle de régulation de la mitose sans Cdc25.

Une situation semblable pourrait aussi expliquer l'absence des kinases Cak1 et Cks1, qui sont des kinases activatrices de la CDK. La phosphorylation sur la boucle T de la CDK que procure la Cak1 est normalement essentielle au rôle de commutateur que doit jouer la Cdc28 afin d'enclencher la mitose de façon expéditive, car elle augmente l'activité de la CDK de 80 à 300 fois¹⁹⁷. Mais comme plusieurs protéines déjà analysées, les séquences de Cak1 et de Cks1 ne sont pas conservées au cours de l'évolution¹⁹⁸, ce qui peut expliquer son absence de nos séquences.

Le complexe APC/C ne possède que quelques sous-unités (4 sur un total de 12) et deux des plus importantes chez *S. cerevisiae*, la protéine Ring-Finger (Apc11) et la protéine de liaison (Apc2)¹⁷¹, ne font pas partie du transcriptome. Par contre, la protéine adaptatrice Cdc20, qui permet le complexe APC/C de cibler les Clb5/6¹⁷⁸, est présente à l'intérieur de nos séquences. En contraste avec *S. cerevisiae*, *S. pombe* n'exprime que les sous-unités Apc1, Apc2, Apc11, Cdc16, Cdc27, Cdc23 et Doc1¹⁹⁹. Il a même été démontré que le complexe APC/C des trypanosomes possède seulement Apc1, Cdc16, Cdc27, Cdc23 et Doc1)²⁰⁰, ce qui est très similaire aux protéines retrouvées chez *L. polyedrum*. La découverte du complexe APC/C est rassurante, car il est responsable d'une grande partie de l'ubiquitination, et donc de la dégradation, de plusieurs substrats, comme les cyclines de la phase S, les cyclines mitotiques et les sécurines. Le complexe APC/C permet aussi de synchroniser la dégradation de ses différents substrats afin que les événements du cycle cellulaire s'enchaînent dans un ordre précis, permettant ainsi au cycle cellulaire de poursuivre. En dégradant les cyclines de la phase M, le complexe APC/C est aussi responsable de préparer la cellule à recommencer un nouveau cycle cellulaire. Des études

ont déjà démontré la présence de dégradation de cyclines de phases M régulées par l'APC/C ²⁰¹.

Chez les dinoflagellés, la présence du point de contrôle SAC (spindle assembly checkpoint) lors de la mitose a été démontrée par l'utilisation de la nocodazole, qui empêche la polymérisation des microtubules et donc l'attachement des kinétochores aux chromosomes ²⁰¹. Les observations de notre transcriptome appuie cette recherche, car la majorité des protéines comprises dans le SAC sont présentes. La première protéine essentielle au SAC est la Mps1, une kinase impliquée dans l'attachement du kinétochore au chromosome. Mps1 est une protéine essentielle dans le cycle cellulaire de la levure comme dans celui de l'humain (Lan 2010) et se trouve parmi nos séquences. La protéine Mad2, aussi essentielle pour le SAC, se trouve également dans notre transcriptome, et c'est d'ailleurs cette dernière qui bloque la transition métaphase-anaphase en réponse à la nocodazole ²⁰¹. À l'instar de Mps1, la protéine Mad1 n'est pas essentielle au SAC ²⁰² et n'est pas dans le transcriptome, tout comme Mad3, qui possède une grande homologie avec Mad1. Bub3, présente chez *Lingulodinium*, n'est pas essentielle dans la levure, mais elle l'est chez les organismes supérieurs. Bub3 est une protéine WD40 repeat qui s'associe avec Bub1, Cdc20 et Mad2/3 ²⁰³. Bub1 est une sérine/thréonine kinase clé dans le SAC, il y a donc de bonnes chances que cette protéine existe dans le SAC chez *L. polyedrum*, mais que la séquence n'apparaisse pas dans le transcriptome.

En ce qui concerne la voie de signalisation pour les kinétochores désalignés, elle est loin d'être complète. Il en est de même pour le point de contrôle relié au dommage à l'ADN, les protéines Chk1 et Chk2 (Dun1) ont beau être présentes, la majorité des autres protéines sont absentes du système. Ces deux systèmes affectent en fin de compte la sécurine, qui inhibe normalement la séparase, qui dégrade les cohésines qui fixent les chromatides sœurs l'une à l'autre. La problématique avec nos observations est que ni la sécurine (Pds1), ni la séparase (Esp1) ne sont retrouvées à l'intérieur du transcriptome. La

séparase est une autre protéine dont la séquence varie d'une espèce à l'autre ²⁰⁴, et son absence du transcriptome peut s'expliquer par cette absence de conservation.

En résumé, la transcriptome est un outil qui permet de dresser un catalogue des protéines présentes chez d'autres espèces et qui sont bien conservées chez *L. polyedrum*. Ces protéines permettent d'établir des schémas de base pour des systèmes complexes comme le cycle cellulaire. Mais comme les dinoflagellés possèdent des caractéristiques uniques, il reste encore beaucoup de travail afin de retracer les divergences qui ont mené à ces caractéristiques et qui font en sorte que *L. polyedrum* est une espèce fascinante à étudier.

Conclusion

Les buts initiaux de cette recherche étaient de finaliser la caractérisation de la LpCyc1 et de trouver la CDK de la phase M chez *Lingulodinium polyedrum*.

La caractérisation complète de la LpCyc1 comportait son expression, sa phosphorylation et sa localisation. L'expression et les patrons de phosphorylation de la LpCyc1 concordent de façon temporelle avec la mitose. La séquence de la protéine permettait de penser que la LpCyc1 était une cycline de la phase M, bien qu'elle ait auparavant été isolée en récupérant une levure mutante défailante de cyclines de la phase S⁴⁹. En combinant les résultats de l'analyse de la séquence avec ceux de la caractérisation présente dans, nous pouvons donc confirmer que la LpCyc1 est une cycline permettant de réguler la mitose. La caractérisation de la LpCyc1 sera complète avec des observations au microscope électronique à partir de cultures de cellules synchronisées.

En ce qui concerne la découverte de la CDK, bien qu'encore aucune expérience en laboratoire, toutes les données bioinformatiques semblent concluantes. La similitude avec la Cdc28 de *S. cerevisiae* et la présence de tous les domaines conservés essentiels aux CDK nous indiquent que nous avons déniché la LpCdk1. Dans les recherches futures, il faudra caractériser la LpCdk1 selon les mêmes aspects que la LpCyc1, son expression, sa phosphorylation et sa localisation. Il faudra aussi confirmer ces découvertes en démontrant la liaison entre la LpCyc1 et la LpCdk1 afin que la CDK puisse phosphoryler ses substrats.

Bien qu'il n'était pas un but premier dans cette recherche, le transcriptome de *Lingulodinium polyedrum* créé à partir des ARNm séquencés par Illumina est sans doute la contribution majeure qui va affecter les études futures sur cet organisme. L'identification de la LpCdk1 à partir du transcriptome démontre que cet outil permet de trouver des protéines avec des domaines conservés de façon rapide et efficace.

Bibliographie

1. Falkowski, P.G., Barber, R.T. & Smetacek, V. Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production. *Science* **281**, 200-206 (1998).
2. Mayfield, A.B. & Gates, R.D. Osmoregulation in anthozoan–dinoflagellate symbiosis. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* **147**, 1-10 (2007).
3. Douglas, A.E. Coral bleaching--how and why? *Mar Pollut Bull* **46**, 385-92 (2003).
4. Waters, A.L., Hill, R.T., Place, A.R. & Hamann, M.T. The expanding role of marine microbes in pharmaceutical development. *Curr Opin Biotechnol* **21**, 780-6.
5. Adl, S.M. et al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* **52**, 399-451 (2005).
6. Patron, N.J., Waller, R.F. & Keeling, P.J. A tertiary plastid uses genes from two endosymbionts. *J Mol Biol* **357**, 1373-82 (2006).
7. Dodge, J.D. Chromosome structure in the dinoflagellate and the problem of the mesokaryotic cell. *Excerpta med. int. Congr. Ser.* **91**, 339 (1965).
8. Rizzo, P. in The biology of dinoflagellates. (ed. Taylor, F.J.R.) 143-173 (Blackwell Scientific, Oxford, 1987).
9. Sparrow, A.H., Price, H.J. & Underbrink, A.G. A survey of DNA content per cell and per chromosome of prokaryotic and eukaryotic organisms: some evolutionary considerations. *Brookhaven Symp Biol* **23**, 451-94 (1972).
10. Rill, R.L., Livolant, F., Aldrich, H.C. & Davidson, M.W. Electron microscopy of liquid crystalline DNA: direct evidence for cholesteric-like organization of DNA in dinoflagellate chromosomes. *Chromosoma* **98**, 280-6 (1989).

11. Bouligand, Y. & Norris, V. Chromosome separation and segregation in dinoflagellates and bacteria may depend on liquid crystalline states. *Biochimie* **83**, 187-92 (2001).
12. Costas, E. & Goyanes, V. Architecture and evolution of dinoflagellate chromosomes: an enigmatic origin. *Cytogenet Genome Res* **109**, 268-275 (2005).
13. Spector, D., Vasconcelos, A. & Triemer, R. DNA duplication and chromosome structure in the dinoflagellates. *Protoplasma* **105**, 185-195 (1981).
14. Rizzo, P. The enigma of the dinoflagellate chromosome. *J. Protozool.* **38**, 246-252 (1991).
15. Sigee, D.C. Structural DNA and genetically active DNA in dinoflagellate chromosomes. *Biosystems* **16**, 203-210 (1983).
16. Soyer-Gobillard, M.O. et al. Location of B- and Z-DNA in the chromosomes of a primitive eukaryote dinoflagellate. *J. Cell Biol.* **111**, 293-304 (1990).
17. Herzog, M. & Soyer, M.-O. Distinctive features of dinoflagellate chromatin. Absence of nucleosomes in a primitive species *Prorocentrum micans*. *Eur. J. Cell Biol.* **23**, 295-302 (1981).
18. Sala-Rovira, M. et al. Molecular cloning and immunolocalization of two variants of the major basic nuclear protein (HCc) from the histone-less eukaryote *Cryptothecodinium cohnii* (Pyrrophyta). *Chromosoma* **100**, 510-518. (1991).
19. Triplett, E.L. et al. Characterization of two full-length cDNA sequences encoding for apoproteins of peridinin-chlorophyll a-protein (PCP) complexes. *Mol Mar Biol Biotechnol* **2**, 246-54 (1993).
20. Rae, P.M. & Steele, R.E. Modified bases in the DNAs of unicellular eukaryotes: an examination of distributions and possible roles, with emphasis on hydroxymethyluracil in dinoflagellates. *Biosystems* **10**, 37-53 (1978).
21. Steele, R.E. & Rae, P.M. Ordered distribution of modified bases in the DNA of a dinoflagellate. *Nucleic Acids Res* **8**, 4709-25 (1980).

22. Hinnebusch, A.G., Klotz, L.C., Immergut, E. & Loeblich, A.R., 3rd. Deoxyribonucleic acid sequence organization in the genome of the dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*. *Biochemistry* **19**, 1744-55 (1980).
23. Moreau, H., Geraud, M.L., Bhaud, Y. & Soyer-Gobillard, M.O. Cloning, characterization and chromosomal localization of a repeated sequence in *Cryptothecodinium cohnii*, a marine dinoflagellate. *Int Microbiol* **1**, 35-43 (1998).
24. Raikov, I.B. [Nuclear differentiation and nuclear heteromorphism in the protozoa]. *Tsitologiya* **34**, 3-16 (1992).
25. Spector, D.L. & Triemer, R.E. Chromosome structure and mitosis in the dinoflagellates: an ultrastructural approach to an evolutionary problem. *Biosystems* **14**, 289-98 (1981).
26. Spector, D. (ed.) *Dinoflagellates* (Academic Press, New York, 1984).
27. Cachon, J. & Cachon, M. Observations on the mitosis and on the chromosome evolution during the lifecycle of *Oodinium*, a parasitic dinoflagellate. *Chromosoma* **60**, 237-51 (1977).
28. Yeung, P.K. et al. The spindle checkpoint in the dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*. *Exp Cell Res* **254**, 120-9 (2000).
29. Soyer-Gobillard, M.O., Ausseil, J. & Geraud, M.L. Nuclear and cytoplasmic actin in dinoflagellates. *Biology of the Cell* **87**, 17-35 (1996).
30. Lee, D.-H., Mittag, M., Szczekan, S., Morse, D. & Hastings, J.W. Molecular cloning and genomic organization of a gene for luciferin-binding protein from the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 8842-8850 (1993).
31. Li, L.M. & Hastings, J.W. The structure and organization of the luciferase gene in the photosynthetic dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Plant Molecular Biology* **36**, 275-284 (1998).
32. Machabee, S., Wall, L. & Morse, D. Expression and genomic organization of a dinoflagellate gene family. *Plant Molecular Biology* **25**, 23-31 (1994).

33. Le, Q.H., Markovic, P., Hastings, J.W., Jovine, R.V.M. & Morse, D. Structure and organization of the peridinin chlorophyll a binding protein gene in *Gonyaulax polyedra*. *Molecular & General Genetics* **255**, 595-604 (1997).
34. ten Lohuis, M.R. & Miller, D.J. Light-regulated transcription of genes encoding peridinin chlorophyll a proteins and the major intrinsic light-harvesting complex proteins in the dinoflagellate *amphidinium carterae* hulburt (Dinophyceae). Changes In cytosine methylation accompany photoadaptation. *Plant Physiol* **117**, 189-96 (1998).
35. Elias, M.C., Marques-Porto, R., Freymuller, E. & Schenkman, S. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. *Mol Biochem Parasitol* **112**, 79-90 (2001).
36. Taroncher-Oldenburg, G. & Anderson, D.M. Identification and characterization of three differentially expressed genes, encoding S-adenosylhomocysteine hydrolase, methionine aminopeptidase, and a histone-like protein, in the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Applied & Environmental Microbiology* **66**, 2105-2112 (2000).
37. Hastings, J.W. Chemistries and colors of bioluminescent reactions - a review. *Gene* **173**, 5-11 (1996).
38. Okamoto, O.K., Shao, L.M., Hastings, J.W. & Colepicolo, P. Acute and chronic effects of toxic metals on viability, encystment and bioluminescence in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Comparative Biochemistry & Physiology C, Comparative Pharmacology & Toxicology* **123**, 75-83 (1999).
39. Blumenthal, T. Trans-splicing and operons. *WormBook*, 1-9 (2005).
40. Mayer, M.G. & Floeter-Winter, L.M. Pre-mRNA trans-splicing: from kinetoplastids to mammals, an easy language for life diversity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **100**, 501-13 (2005).
41. Pouchkina-Stantcheva, N.N. & Tunnacliffe, A. Spliced leader RNA-mediated trans-splicing in phylum Rotifera. *Mol Biol Evol* **22**, 1482-9 (2005).
42. Hastings, K.E. SL trans-splicing: easy come or easy go? *Trends Genet* **21**, 240-7 (2005).

43. Zhang, H., Campbell, D.A., Sturm, N.R. & Lin, S. Dinoflagellate spliced leader RNA genes display a variety of sequences and genomic arrangements. *Mol Biol Evol* **26**, 1757-71 (2009).
44. Slamovits, C.H. & Keeling, P.J. Widespread recycling of processed cDNAs in dinoflagellates. *Curr Biol* **18**, R550-2 (2008).
45. Zhang, H. et al. Spliced leader RNA trans-splicing in dinoflagellates. *PNAS* **104**, 4618-4623 (2007).
46. Lidie, K.B. & van Dolah, F.M. Spliced leader RNA-mediated trans-splicing in a dinoflagellate, *Karenia brevis*. *J Eukaryot Microbiol* **54**, 427-35 (2007).
47. Bachvaroff, T.R. & Place, A.R. From stop to start: tandem gene arrangement, copy number and trans-splicing sites in the dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *PLoS One* **3**, e2929 (2008).
48. McMurtry, L. & Hastings, J.W. No desynchronization among four circadian rhythms in the unicellular alga, *Gonyaulax polyedra*. *Science* **175**, 1137-1139 (1972).
49. Bertomeu, T. & Morse, D. in Biochemical & Biophysical Research Communications 1172-1183 (2004).
50. Alberts, B. et al. Molecular Biology of the Cell (Garland Science, New York, 2007).
51. Deshaies, R.J. Phosphorylation and proteolysis: partners in the regulation of cell division in budding yeast. *Current Opinion in Genetics & Development* **7**, 7-16 (1997).
52. Edgington, N.P. & Futcher, B. Relationship between the function and the location of G1 cyclins in *S. cerevisiae*. *J Cell Sci* **114**, 4599-4611 (2001).
53. Mendenhall, M.D. & Hodge, A.E. Regulation of cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology & Molecular Biology Reviews* **62**, 1191-1243 (1998).
54. Hubler, L., Bradshaw-Rouse, J. & Heideman, W. Connections between the Ras-cyclic AMP pathway and G1 cyclin expression in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **13**, 6274-82 (1993).

55. Polymenis, M. & Schmidt, E.V. Coupling of cell division to cell growth by translational control of the G1 cyclin CLN3 in yeast. *Genes Dev* **11**, 2522-31 (1997).
56. Alberghina, L., Rossi, R.L., Querin, L., Wanke, V. & Vanoni, M. A cell sizer network involving Cln3 and Far1 controls entrance into S phase in the mitotic cycle of budding yeast. *J. Cell Biol.* **167**, 433-443 (2004).
57. Costanzo, M. et al. CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast. *Cell* **117**, 899-913 (2004).
58. de Bruin, R.A.M., McDonald, W.H., Kalashnikova, T.I., Yates, J., III & Wittenberg, C. Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF transcription bound repressor Whi5. *Cell* **117**, 887-898 (2004).
59. Morgan, D.O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 261-91 (1997).
60. Stuart, D. & Wittenberg, C. CLN3, not positive feedback, determines the timing of CLN2 transcription in cycling cells. *Genes Dev.* **9**, 2780-2794 (1995).
61. Draviam, V.M., Orrechia, S., Lowe, M., Pardi, R. & Pines, J. The Localization of Human Cyclins B1 and B2 Determines CDK1 Substrate Specificity and Neither Enzyme Requires MEK to Disassemble the Golgi Apparatus. *J. Cell Biol.* **152**, 945-958 (2001).
62. Bloom, J. & Cross, F.R. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**, 149-160 (2007).
63. Nakayama, K.I. & Nakayama, K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 369-81 (2006).
64. Desai, D., Wessling, H.C., Fisher, R.P. & Morgan, D.O. Effects of phosphorylation by CAK on cyclin binding by CDC2 and CDK2. *Mol Cell Biol* **15**, 345-50 (1995).
65. Coleman, T.R. & Dunphy, W.G. Cdc2 regulatory factors. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 877-82 (1994).

66. Baldin, V. & Ducommun, B. Subcellular localisation of human wee1 kinase is regulated during the cell cycle. *J Cell Sci* **108**, 2425-2432 (1995).
67. Heald, R., McLoughlin, M. & McKeon, F. Human wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated cdc2 kinase. *Cell* **74**, 463-474 (1993).
68. Pomerening, J.R., Sontag, E.D. & Ferrell, J.E., Jr. Building a cell cycle oscillator: hysteresis and bistability in the activation of Cdc2. *Nat Cell Biol* **5**, 346-51 (2003).
69. Cohen-Fix, O., Peters, J.M., Kirschner, M.W. & Koshland, D. Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev* **10**, 3081-93 (1996).
70. Musacchio, A. & Salmon, E.D. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 379-93 (2007).
71. Sullivan, M. & Morgan, D.O. Finishing mitosis, one step at a time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 894-903 (2007).
72. Sveiczer, A., Tyson, J.J. & Novak, B. Modelling the fission yeast cell cycle. *Brief Funct Genomic Proteomic* **2**, 298-307 (2004).
73. De Bondt, H.L. et al. Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* **363**, 595-602 (1993).
74. Russo, A.A., Jeffrey, P.D. & Pavletich, N.P. Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat Struct Biol* **3**, 696-700 (1996).
75. Nigg, E.A. Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Curr Opin Cell Biol* **8**, 312-7 (1996).
76. Reddy, K.L. et al. The *Drosophila* PAR domain protein 1 (Pdp1) gene encodes multiple differentially expressed mRNAs and proteins through the use of multiple enhancers and promoters. *Developmental Biology* **224**, 401-414 (2000).
77. Jeffrey, P.D. et al. Mechanism of cdk activation revealed by the structure of a cyclin A-cdk2 complex. *Nature* **376**, 313-320 (1995).

78. Evans, T., Rosenthal, E., Youngblom, J., Distel, D. & Hunt, T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**, 389-396 (1983).
79. Morgan, D.O. The dynamics of cyclin dependent kinase structure. *Current Opinion in Cell Biology* **8**, 767-772 (1996).
80. Nasmyth, K. Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase. *Curr Opin Cell Biol* **5**, 166-79 (1993).
81. Loog, M. & Morgan, D.O. Cyclin specificity in the phosphorylation of cyclin-dependent kinase substrates. *Nature* **434**, 104-8 (2005).
82. Perry, J.A. & Kornbluth, S. Cdc25 and Wee1: analogous opposites? *Cell Div* **2**, 12 (2007).
83. Graves, P.R., Lovly, C.M., Uy, G.L. & Piwnicka-Worms, H. Localization of human Cdc25C is regulated both by nuclear export and 14-3-3 protein binding. *Oncogene* **20**, 1839-51 (2001).
84. Takizawa, C.G. & Morgan, D.O. Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 658-65 (2000).
85. Peter, M. & Herskowitz, I. Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1. *Science* **265**, 1228-31 (1994).
86. Mendenhall, M.D. An inhibitor of p34CDC28 protein kinase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **259**, 216-9 (1993).
87. Lenburg, M.E. & O'Shea, E.K. Signaling phosphate starvation. *Trends Biochem Sci* **21**, 383-7 (1996).
88. Chang, F. & Herskowitz, I. Identification of a gene necessary for cell cycle arrest by a negative growth factor of yeast: FAR1 is an inhibitor of a G1 cyclin, CLN2. *Cell* **63**, 999-1011 (1990).
89. Schneider, K.R., Smith, R.L. & O'Shea, E.K. Phosphate-regulated inactivation of the kinase PHO80-PHO85 by the CDK inhibitor PHO81. *Science* **266**, 122-6 (1994).

90. Feldman, R.M., Correll, C.C., Kaplan, K.B. & Deshaies, R.J. A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* **91**, 221-30 (1997).
91. Moreno, S. & Nurse, P. Regulation of progression through the G1 phase of the cell cycle by the rum1+ gene. *Nature* **367**, 236-42 (1994).
92. Benito, J., Martin-Castellanos, C. & Moreno, S. Regulation of the G1 phase of the cell cycle by periodic stabilization and degradation of the p25rum1 CDK inhibitor. *EMBO J* **17**, 482-97 (1998).
93. Daga, R.R., Bolanos, P. & Moreno, S. Regulated mRNA stability of the Cdk inhibitor Rum1 links nutrient status to cell cycle progression. *Curr Biol* **13**, 2015-24 (2003).
94. Harper, J.W. & Elledge, S.J. Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr Opin Genet Dev* **6**, 56-64 (1996).
95. Barberis, M. et al. The yeast cyclin-dependent kinase inhibitor Sic1 and mammalian p27(Kip1) are functional homologues with a structurally conserved inhibitory domain. *Biochemical Journal* **387**, 639-647 (2005).
96. Ogawa, N. et al. Promoter analysis of the PHO81 gene encoding a 134 kDa protein bearing ankyrin repeats in the phosphatase regulon of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **238**, 444-54 (1993).
97. Bahler, J. Cell-cycle control of gene expression in budding and fission yeast. *Annu Rev Genet* **39**, 69-94 (2005).
98. Nasmyth, K. & Dirick, L. The role of SWI4 and SWI6 in the activity of G1 cyclins in yeast. *Cell* **66**, 995-1013 (1991).
99. Cosma, M.P., Panizza, S. & Nasmyth, K. Cdk1 triggers association of RNA polymerase to cell cycle promoters only after recruitment of the mediator by SBF. *Molecular Cell* **7**, 1213-1220 (2001).
100. Amon, A., Tyers, M., Futcher, B. & Nasmyth, K. Mechanisms that help the yeast cell cycle clock tick: G2 cyclins transcriptionally activate G2 cyclins and repress G1 cyclins. *Cell* **74**, 993-1007 (1993).

101. Iyer, V.R. et al. Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF. *Nature* **409**, 533-8 (2001).
102. Banerjee, N. & Zhang, M.Q. Identifying cooperativity among transcription factors controlling the cell cycle in yeast. *Nucleic Acids Res* **31**, 7024-31 (2003).
103. Maqbool, Z., Kersey, P.J., Fantes, P.A. & McNerny, C.J. MCB-mediated regulation of cell cycle-specific *cdc22*⁺ transcription in fission yeast. *Mol Genet Genomics* **269**, 765-75 (2003).
104. Peng, X. et al. Identification of cell cycle-regulated genes in fission yeast. *Mol Biol Cell* **16**, 1026-42 (2005).
105. Althoefer, H., Schleiffer, A., Wassmann, K., Nordheim, A. & Ammerer, G. Mcm1 is required to coordinate G2-specific transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **15**, 5917-28 (1995).
106. Kumar, R. et al. Forkhead transcription factors, Fkh1p and Fkh2p, collaborate with Mcm1p to control transcription required for M-phase. *Curr Biol* **10**, 896-906 (2000).
107. Reynolds, D. et al. Recruitment of Thr 319-phosphorylated Ndd1p to the FHA domain of Fkh2p requires Clb kinase activity: a mechanism for CLB cluster gene activation. *Genes Dev* **17**, 1789-802 (2003).
108. Jorgensen, P. & Tyers, M. The fork'ed path to mitosis. *Genome Biol* **1**, REVIEWS1022 (2000).
109. Dohrmann, P.R. et al. Parallel pathways of gene regulation: homologous regulators SWI5 and ACE2 differentially control transcription of HO and chitinase. *Genes Dev* **6**, 93-104 (1992).
110. Nasmyth, K., Adolf, G., Lydall, D. & Seddon, A. The identification of a second cell cycle control on the HO promoter in yeast: cell cycle regulation of SW15 nuclear entry. *Cell* **62**, 631-47 (1990).
111. Weiss, E.L. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* Mob2p-Cbk1p kinase complex promotes polarized growth and acts with the mitotic exit network to facilitate

- daughter cell-specific localization of Ace2p transcription factor. *J Cell Biol* **158**, 885-900 (2002).
112. Bertrand, E. et al. Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Mol Cell* **2**, 437-45 (1998).
 113. Laabs, T.L. et al. ACE2 is required for daughter cell-specific G1 delay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10275-80 (2003).
 114. Johnson, D.G., Schwarz, J.K., Cress, W.D. & Nevins, J.R. Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* **365**, 349-52 (1993).
 115. Ross, J.F., Liu, X. & Dynlacht, B.D. Mechanism of transcriptional repression of E2F by the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Mol Cell* **3**, 195-205 (1999).
 116. Mitnacht, S. Control of pRB phosphorylation. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 21-7 (1998).
 117. Castro, A., Bernis, C., Vigneron, S., Labbe, J.C. & Lorca, T. The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle. *Oncogene* **24**, 314-25 (2005).
 118. Rape, M., Reddy, S.K. & Kirschner, M.W. The processivity of multiubiquitination by the APC determines the order of substrate degradation. *Cell* **124**, 89-103 (2006).
 119. Mailand, N. & Diffley, J.F. CDKs promote DNA replication origin licensing in human cells by protecting Cdc6 from APC/C-dependent proteolysis. *Cell* **122**, 915-26 (2005).
 120. Nakayama, K. et al. Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *Embo J* **19**, 2069-81 (2000).
 121. Ishida, N. et al. Phosphorylation of p27Kip1 on serine 10 is required for its binding to CRM1 and nuclear export. *J Biol Chem* **277**, 14355-8 (2002).
 122. Jin, J. et al. SCFbeta-TRCP links Chk1 signaling to degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *Genes Dev* **17**, 3062-74 (2003).

123. Guardavaccaro, D. & Pagano, M. Oncogenic aberrations of cullin-dependent ubiquitin ligases. *Oncogene* **23**, 2037-49 (2004).
124. Andrews, B. & Measday, V. The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea. *Trends in Genetics* **14**, 66-72 (1998).
125. Pines, J.J. & Hunter, T.T. Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *The Journal of cell biology* **115**, 1-17 (1991).
126. Clute, P. & Pines, J. Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nat Cell Biol* **1**, 82-7 (1999).
127. Hagting, A., Jackman, M., Simpson, K. & Pines, J. Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Curr Biol* **9**, 680-9 (1999).
128. Yang, J. et al. Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev* **12**, 2131-43 (1998).
129. Moore, J.D., Kirk, J.A. & Hunt, T. Unmasking the S-phase-promoting potential of cyclin B1. *Science* **300**, 987-990 (2003).
130. Takizawa, C.G., Weis, K. & Morgan, D.O. Ran-independent nuclear import of cyclin B1-Cdc2 by importin beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7938-43 (1999).
131. Li, J., Meyer, A.N. & Donoghue, D.J. Requirement for phosphorylation of cyclin B1 for *Xenopus* oocyte maturation. *Mol Biol Cell* **6**, 1111-24 (1995).
132. Dalal, S.N., Schweitzer, C.M., Gan, J. & DeCaprio, J.A. Cytoplasmic localization of human cdc25C during interphase requires an intact 14-3-3 binding site. *Mol Cell Biol* **19**, 4465-79 (1999).
133. Peng, C.Y. et al. C-TAK1 protein kinase phosphorylates human Cdc25C on serine 216 and promotes 14-3-3 protein binding. *Cell Growth Differ* **9**, 197-208 (1998).
134. Tang, Y. & Reed, S.I. The Cdk-associated protein Cks1 functions both in G1 and G2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **7**, 822-32 (1993).

135. Thron, C.D. A model for a bistable biochemical trigger of mitosis. *Biophys Chem* **57**, 239-51 (1996).
136. Stratmann, M. & Schibler, U. Properties, entrainment, and physiological functions of mammalian peripheral oscillators. *J Biol Rhythms* **21**, 494-506 (2006).
137. Lee, C.C. The circadian clock and tumor suppression by mammalian period genes. *Methods Enzymol* **393**, 852-61 (2005).
138. Homma, K. & Hastings, J.W. Cell growth kinetics, division asymmetry and volume control at division in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*: a model of circadian clock control of the cell cycle. *J Cell Sci* **92**, 303-318 (1989).
139. Bjarnason, G.A. & Jordan, R. Circadian variation of cell proliferation and cell cycle protein expression in man: clinical implications. *Prog Cell Cycle Res* **4**, 193-206 (2000).
140. Brown, W.R. A review and mathematical analysis of circadian rhythms in cell proliferation in mouse, rat, and human epidermis. *J Invest Dermatol* **97**, 273-80 (1991).
141. Buchi, K.N., Moore, J.G., Hrushesky, W.J., Sothorn, R.B. & Rubin, N.H. Circadian rhythm of cellular proliferation in the human rectal mucosa. *Gastroenterology* **101**, 410-5 (1991).
142. Garcia, M.N., Barbeito, C.G., Andrini, L.A. & Badran, A.F. Circadian rhythm of DNA synthesis and mitotic activity in tongue keratinocytes. *Cell Biol Int* **25**, 179-83 (2001).
143. Scheving, L.E., Tsai, T.H. & Scheving, L.A. Chronobiology of the intestinal tract of the mouse. *Am J Anat* **168**, 433-65 (1983).
144. Smaaland, R. Circadian rhythm of cell division. *Prog Cell Cycle Res* **2**, 241-66 (1996).
145. Matsuo, T. et al. Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science* **302**, 255-259 (2003).

146. Cardone, L. & Sassone-Corsi, P. Timing the cell cycle. *Nat Cell Biol* **5**, 859-61 (2003).
147. Dunlap, J.C. Physiology. Running a clock requires quality time together. *Science* **311**, 184-6 (2006).
148. Pagueiro, A.M., Liu, Q., Baker, C.L., Dunlap, J.C. & Loros, J.J. The *Neurospora* checkpoint kinase 2: a regulatory link between the circadian and cell cycles. *Science* **313**, 644-9 (2006).
149. Gery, S. et al. The circadian gene *per1* plays an important role in cell growth and DNA damage control in human cancer cells. *Mol Cell* **22**, 375-82 (2006).
150. Leveson, A., Wong, F. & Wong, J.T.Y. Cyclins in a dinoflagellate cell cycle. *Molecular Marine Biology & Biotechnology* **6**, 172-179 (1997).
151. Bhaud, Y., Barbier, M. & Soyergobillard, M.O. A detailed study of the complex cell cycle of the dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* bielefeld and evidence for variation in histone h1 kinase activity. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **41**, 519-526 (1994).
152. Dagenais-Bellefeuille, S., Bertomeu, T. & Morse, D. S-phase and M-phase timing are under independent circadian control in the dinoflagellate *Lingulodinium*. *J Biol Rhythms* **23**, 400-8 (2008).
153. Rodriguez, M., Cho, J.W., Sauer, H.W. & Rizzo, P.J. Evidence for the presence of a *cdc2* like protein kinase in the dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **40**, 91-96 (1993).
154. Van Dolah, F.M., Leighfield, T.A., Sandel, H.D. & Hsu, C.K. Cell division in the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* is phased to the diurnal cycle and accompanied by activation of the cell cycle regulatory protein, CDC2 kinase. *Journal of Phycology* **31**, 395-400 (1995).
155. Salois, P. & Morse, D. Do dinoflagellates contain a Cdc2-like protein kinase? *Molecular Marine Biology & Biotechnology* **5**, 52-61 (1996).
156. Haase, S.B. & Reed, S.I. Evidence that a free-running oscillator drives G1 events in the budding yeast cell cycle. *Nature* **401**, 394-397 (1999).

157. Fitch, I. et al. Characterization of four B-type cyclin genes of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **3**, 805-818 (1992).
158. Bertomeu, T. & Morse, D. A Dinoflagellate AAA Family Member Rescues a Conditional Yeast G1/S Phase Cyclin Mutant through Increased CLB5 Accumulation. *Protist* **158**, 473-485 (2007).
159. Hanson, P.I. & Whiteheart, S.W. AAA+ proteins: have engine, will work. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 519-529 (2005).
160. Sauer, R.T. et al. Sculpting the proteome with AAA+ proteases and disassembly machines. *Cell* **119**, 9-18 (2004).
161. Bertomeu, T., Rivoal, J. & Morse, D. A dinoflagellate CDK5-like cyclin-dependent kinase. *Biology of the Cell* **099**, 531-540 (2007).
162. Brown, T., Mackey, K. & Du, T. in Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., 2001).
163. Kurtz, S. et al. Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol* **5**, R12 (2004).
164. Altschul Sf Fau - Gish, W., Gish W Fau - Miller, W., Miller W Fau - Myers, E.W., Myers Ew Fau - Lipman, D.J. & Lipman, D.J. Basic local alignment search tool.
165. Surana, U. et al. The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast *S. cerevisiae*. *Cell* **65**, 145-161 (1991).
166. Gorg, A., Weiss, W. & Dunn, M.J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **4**, 3665-85 (2004).
167. Smith, C.L., Debouck, C., Rosenberg, M. & Culp, J.S. Phosphorylation of serine residue 89 of human adenovirus E1A proteins is responsible for their characteristic electrophoretic mobility shifts, and its mutation affects biological function. *J Virol* **63**, 1569-77 (1989).
168. Bose, I. et al. Assembly of scaffold-mediated complexes containing Cdc42p, the exchange factor Cdc24p, and the effector Cla4p required for cell cycle-regulated phosphorylation of Cdc24p. *J Biol Chem* **276**, 7176-86 (2001).

169. Li, L.M., Hong, R. & Hastings, J.W. Three functional luciferase domains in a single polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 8954-8958 (1997).
170. Yeung, P.K.K. & Wong, J.T.Y. Inhibition of cell proliferation by mechanical agitation involves transient cell cycle arrest at G1 phase in dinoflagellates. *Protoplasma* **220**, 173-178 (2003).
171. Nakayama, K.I. & Nakayama, K. Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 323-33 (2005).
172. Willems, A.R. et al. SCF ubiquitin protein ligases and phosphorylation-dependent proteolysis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**, 1533-50 (1999).
173. Schwob, E., Bohm, T., Mendenhall, M.D. & Nasmyth, K. The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell* **79**, 233-244 (1994).
174. McKinney, J.D., Chang, F., Heintz, N. & Cross, F.R. Negative regulation of FAR1 at the Start of the yeast cell cycle. *Genes & Development* **7**, 833-843 (1993).
175. Elion, E.A., Brill, J.A. & Fink, G.R. FUS3 represses CLN1 and CLN2 and in concert with KSS1 promotes signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9392-6 (1991).
176. Elion, E.A., Brill, J.A. & Fink, G.R. Functional redundancy in the yeast cell cycle: FUS3 and KSS1 have both overlapping and unique functions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **56**, 41-9 (1991).
177. Toone, W.M., Aerne, B.L., Morgan, B.A. & Johnston, L.H. Getting started: regulating the initiation of DNA replication in yeast. *Annu Rev Microbiol* **51**, 125-49 (1997).
178. Shirayama, M., Toth, A., Galova, M. & Nasmyth, K. APC(Cdc20) promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5. *Nature* **402**, 203-7 (1999).

179. Godoy, P.D. et al. Trypanosome prereplication machinery contains a single functional *orc1/cdc6* protein, which is typical of archaea. *Eukaryot Cell* **8**, 1592-603 (2009).
180. Wysocki, R., Javaheri, A., Kristjansdottir, K., Sha, F. & Kron, S.J. CDK Pho85 targets CDK inhibitor Sic1 to relieve yeast G1 checkpoint arrest after DNA damage. *Nature Structural & Molecular Biology* **13**, 908-914 (2006).
181. Booher, R.N., Deshaies, R.J. & Kirschner, M.W. Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. *EMBO J.* **12**, 3417-3426 (1993).
182. Parker, L.L., Atherton-Fessler, S. & Piwnicka-Worms, H. p107wee1 is a dual-specificity kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 2917-2921 (1992).
183. Su, J.Y. & Maller, J.L. Cloning and expression of a xenopus gene that prevents mitotic catastrophe in fission yeast. *Molecular & General Genetics* **246**, 387-396 (1995).
184. Boutros, R., Dozier, C. & Ducommun, B. The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 185-91 (2006).
185. Harvey, S.L. & Kellogg, D.R. Conservation of mechanisms controlling entry into mitosis: budding yeast wee1 delays entry into mitosis and is required for cell size control. *Curr Biol* **13**, 264-75 (2003).
186. Buell, C.R. Current status of the sequence of the rice genome and prospects for finishing the first monocot genome. *Plant Physiol* **130**, 1585-6 (2002).
187. Vandepoele, K. et al. Genome-wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**, 903-16 (2002).
188. Schuppler, U., He, P.H., John, P.C. & Munns, R. Effect of water stress on cell division and cell-division-cycle 2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaves. *Plant Physiol* **117**, 667-78 (1998).

189. Zhang, K., Diederich, L. & John, P.C. The cytokinin requirement for cell division in cultured *Nicotiana plumbaginifolia* cells can be satisfied by yeast Cdc25 protein tyrosine phosphatase: implications for mechanisms of cytokinin response and plant development. *Plant Physiol* **137**, 308-16 (2005).
190. Gonzalez, N. et al. Molecular characterization of a WEE1 gene homologue in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Mol Biol* **56**, 849-61 (2004).
191. Sorrell, D.A. et al. A WEE1 homologue from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **215**, 518-22 (2002).
192. Sun, Y. et al. Characterization of maize (*Zea mays* L.) Wee1 and its activity in developing endosperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4180-5 (1999).
193. Ayaydin, F. et al. Inhibition of serine/threonine-specific protein phosphatases causes premature activation of cdc2MsF kinase at G2/M transition and early mitotic microtubule organisation in alfalfa. *Plant J* **23**, 85-96 (2000).
194. Boudolf, V., Inze, D. & De Veylder, L. What if higher plants lack a CDC25 phosphatase. *Trends in Plant Science* **11**, 474-479 (2006).
195. Fobert, P.R., Gaudin, V., Lunness, P., Coen, E.S. & Doonan, J.H. Distinct classes of cdc2-related genes are differentially expressed during the cell division cycle in plants. *Plant Cell* **8**, 1465-76 (1996).
196. Segers, G. et al. The *Arabidopsis* cyclin-dependent kinase gene *cdc2bAt* is preferentially expressed during S and G2 phases of the cell cycle. *Plant J* **10**, 601-12 (1996).
197. Nigg, E.A., Blangy, A. & Lane, H.A. Dynamic changes in nuclear architecture during mitosis: on the role of protein phosphorylation in spindle assembly and chromosome segregation. *Exp Cell Res* **229**, 174-80 (1996).
198. Liu, J. & Kipreos, E.T. Evolution of cyclin-dependent kinases (CDKs) and CDK-activating kinases (CAKs): Differential conservation of CAKs in yeast and metazoa. *Molecular Biology & Evolution* **17**, 1061-1074 (2000).
199. Schreiber, A. et al. Structural basis for the subunit assembly of the anaphase-promoting complex. *Nature* **470**, 227-32 (2011).

200. Kumar, P. & Wang, C.C. Depletion of anaphase-promoting complex or cyclosome (APC/C) subunit homolog APC1 or CDC27 of *Trypanosoma brucei* arrests the procyclic form in metaphase but the bloodstream form in anaphase. *J Biol Chem* **280**, 31783-91 (2005).
201. Yeung, P.K.K. et al. The spindle checkpoint in the dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*. *Experimental Cell Research* **254**, 120-129 (2000).
202. Rottmann, S. & Luscher, B. The Mad side of the Max network: antagonizing the function of Myc and more. *Curr Top Microbiol Immunol* **302**, 63-122 (2006).
203. Logarinho, E., Resende, T., Torres, C. & Bousbaa, H. The human spindle assembly checkpoint protein Bub3 is required for the establishment of efficient kinetochore-microtubule attachments. *Mol Biol Cell* **19**, 1798-813 (2008).
204. McGrew, J.T., Goetsch, L., Byers, B. & Baum, P. Requirement for ESP1 in the nuclear division of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **3**, 1443-54 (1992).

ANNEXE

E-value = 6.71e-102, Score = 944, Bitscore = 368.237, Identities = 177/292 (60%), Positives = 225/292 (77%), Gaps = 7/292 (2%)
Frame = +1

```

Cdc28          5  LANYKRLEKVGEGTYGVVYKALDLRPGQGQVRVVALKKIRLESEDEGVPSTAIRESILLKE  64
+   Y++LEKVGEGTYGVVYKA D           + ALK IRLE+EDEG+PSTAIRESILLKE
Locus 3321     15  MEQYEKLEKVGEGTYGVVYKAQD----SAGEIYALKTIRLEAEDEGIPSTAIRESILLKE  70

Cdc28          65  LKDDNIVRLYDIVHSDAHKLYLVFEFLDLDLKRYMEGIPKDQPLGADIVKKFMMQLCKGI 124
+   L+  NIVRL D++H++  KL LVFE+LD DLK+ ++      D  L  A   K F+  QL +GI
Locus 3321     71  LQHPNIVRLCDVIHTE-RKLTILVFEYLDQDLKKLLDMC--DGGLDAATTKSFLYQLLRGI 127

Cdc28          125 AYCHSHRILHRDLKPQNLLINKDGNLKLGDGLARAFGVPLRAYTHEIVTLWYRAPEVLL 184
+   AYCH HR+LHRDLKPQNLLIN++G LKL DFGLARAFG+P+R+YTHE+VTLWYRAP+VL+
Locus 3321     128 AYCHQHRVLHRDLKPQNLLINREGALKLADFGLARAFGIPVRSYTHEVVTLWYRAPDVL 187

Cdc28          185 GKGQYSTGVDWTSIGCIFAEMCNRKPIFSGDSEIDQIFKIFRVLGTPNEAIWPDIVYLPD 244
+   G ++YST VD WS+GCIFAEM N +P+F G+++ DQ+ KIF+VLGTP+EA WP I  LPD
Locus 3321     188 GSRKYSTPVDIWSVGCIFAEMVNGRPLFPGNTDADQLQKIFKVLGTPSEASWPSITELPD 247

Cdc28          245 FKPSFPQWRRKDLSQVVPSLDPRGIDLLDKLLAYDPINRISARRAAIHYPYFQ 296
+   KP +PQ+ ++      +VPSLDP G+DLL K+L Y P  R+   +  A  H YF+
Locus 3321     248 WKPDYPQYEQQAWPSIVPSLDPTGVDLLSKMLQYCPDKRVLGKLAMEHEYFR 299

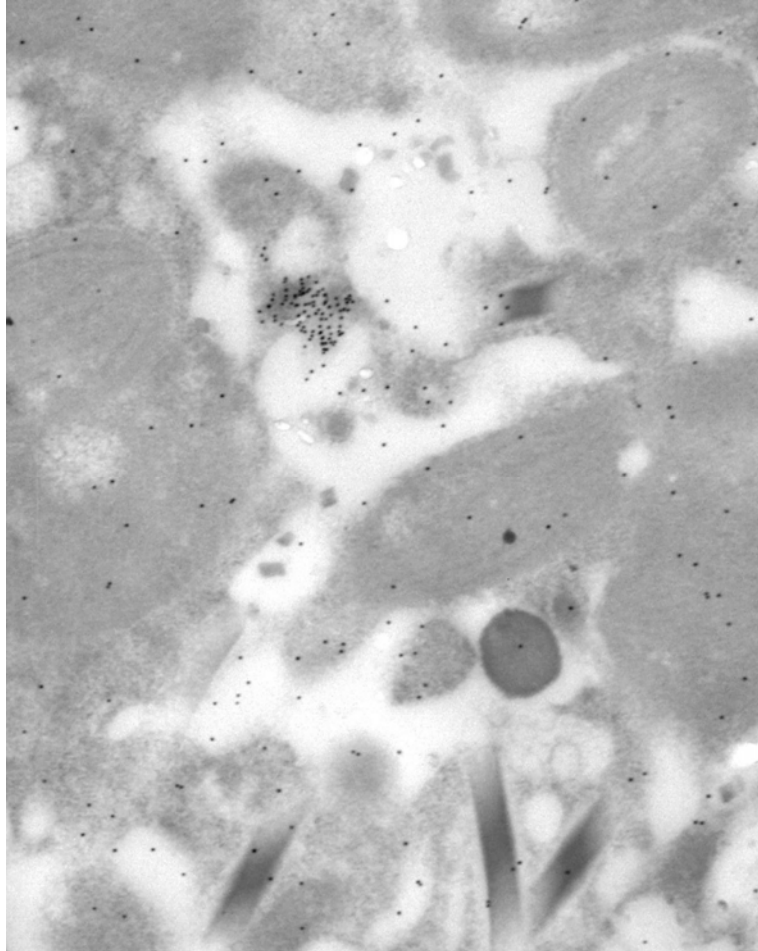
```

Annexe 1. Alignement du contig 3321 et de la Cdc28. Le contig 3321 (ligne du bas) est la séquence avec la meilleure E Value avec un tBLASTn de Cdc28 (ligne du haut) contre le transcriptome de *Lingulodinium polyedrum*. Une séquence consensus est présente entre les deux séquences connues. Un + indique que la polarité de l'a.a. est conservé d'une séquence à l'autre. L'homologie est très grande avec 60% d'identité, et tous les a.a. importants pour les différents domaines d'une CDK (voir Figure 9a) font partie de l'homologie entre Cdc28 et le contig 3321.

Annexe 2. Tableau des principales protéines du cycle cellulaire retrouvées dans le transcriptome de *Lingulodinium polyedrum* associées à des séquences connues pas tBLASTn

Protéine	F-Value contre transcriptome	Nombre de résultats	Numéro du Locus	Résultat du meilleur BLASTn	F-Value du BLASTn	longueur du locus
APC (Cdc27)	1.35E-47	12	23195	CB132345.1 putative subunit of the Anaphase Promoting Complex [Ectocarpus siliculosus]	6E-91	329
Cdc14	4.28E-24	10	27639	XP_002141134.1 dual specificity protein phosphatase CDC14A [Cryptosporidium muris KIN56]	5E-42	127
Cdc20	6.26E-65	20	11423	XP_003082721.1 cell cycle switch protein CCS52A (ISS) [Ostreococcus tauri]	2E-142	327
Cdc28	6.71E-102	20	3321	XP_00275858.1 CDK5, putative [Perkinsus marinus ATCC 50983]	6E-135	292
Cdc4	2.59E-28	20	6402	XP_002309360.1 WD domain-containing protein [Phytophthora infestans T30-4]	5E-130	364
Cdc6	1.11E-17	1	21936	XP_002767389.1 origin recognition complex 1 protein, putative [Perkinsus marinus ATCC 50983]	3E-146	273
Cdh1	1.15E-99	20	11423	XP_003082721.1 cell cycle switch protein CCS52A (ISS) [Ostreococcus tauri]	8E-145	330
Cib1	8.79E-34	17	42847	XP_001746195.1 cyclin B [Monosiga brevicolis MX1]	2E-48	217
Cib2	3.61E-37	18	42487	XP_001746195.1 cyclin B [Monosiga brevicolis MX1]	2E-48	219
Cib3	1.18E-39	16	13464	AA025399.1 mitotic cyclin-Cyc2 [Paramedium tetraurelia]	4E-62	270
Cib4	3.46E-41	14	23666	AAU93350.1 mitotic cyclin 1 [Gonyaulax polyedra]	2E-55	256
Cib5	6.66E-37	15	4216	ADK33544.1 cyclin 2 [Perkinsus marinus]	2E-64	269
Cib6	8.01E-41	17	42487	AA025399.1 mitotic cyclin-Cyc2 [Paramedium tetraurelia]	2E-58	302
Cin1	-	0	-	-	-	-
Cin2	-	0	-	-	-	-
Cin3	8.10E-11	8	32475	AAU93350.1 mitotic cyclin 1 [Gonyaulax polyedra]	1E-51	137
Grr1	1.50E-23	20	39573	XP_002364757.1 PREDICTED: f-box/LRR-repeat protein 20-like isoform 1 [Danio rerio]	2E-42	302
Mcm1	2.76E-10	3	174761	ABF57929.1 MADS box transcription factor TSA6L28 [Triticum aestivum]	2E-22	53
Mim1	-	0	-	-	-	-
Ner1	-	0	-	-	-	-
Sic1	-	0	-	-	-	-
Swe1	1.75E-22	20	30214	CB133486.1 putative kinase wee 1 [Ectocarpus siliculosus]	2E-43	238
SWI5	3.77E-08	1	58864	CB037665.1 related to ZAP1-metallorepressor protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation [Sporisorium reilianum]	2E-12	55
Whi5	-	0	-	-	-	-

Annexe 3



Annexe 3. Spécificité de l'anticorps anti-LpCyc1 observée au MET. La spécificité de l'anticorps est observée ici dans le cytoplasme (zone grise) à LD20. Les points noirs sont les billes d'or couplées avec l'anticorps LpCyc1 et il est possible d'observer une concentration des billes dans une zone où la LpCyc1 est présente. Lorsque LpCyc1 n'est pas présente, la concentration des billes est moindre, comme dans la vacuole (en blanc), dans les chloroplastes (structures ovales lignées) ou encore dans d'autres régions du cytoplasme.